

Universitätsklinikum Jena  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie



# **Der Chemokinrezeptor CXCR4 als potentielle Zielstruktur für die Diagnostik und Therapie maligner Tumore**

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Christiane Anne Reimann  
geboren am 02.10.1980 in Plauen

Erstgutachter: apl. Prof. Dr. Amelie Lupp  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena

Zweitgutachter: PD Dr. Andreas Seeling  
Institut für Pharmazie, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Drittgutachter: Prof. Dr. Dieter Hörsch  
Zentralklinik Bad Berka

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18.02.2016

# Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Zusammenfassung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>1) Einleitung</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1) CXCL12 – ein Chemokin                                       | 3         |
| 1.1.1) Chemokine   | 3         |
| 1.1.2) Das Chemokin CXCL12                                       | 4         |
| 1.2) Der CXCR4 – ein Chemokinrezeptor                            | 5         |
| 1.2.1) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren                           | 5         |
| 1.2.2) Chemokinrezeptoren  | 6         |
| 1.2.3) Der Chemokinrezeptor CXCR4                                | 6         |
| 1.3) Bindung von CXCL12 an den CXCR4 und Signaltransduktion      | 6         |
| 1.3.1) Bindungsmodus   | 7         |
| 1.3.2) Intrazelluläre Signaltransduktion des CXCR4               | 8         |
| 1.4) Die CXCR4-CXCL12-Achse                                      | 8         |
| 1.5) CXCR4 und CXCL12 in Neoplasien                              | 9         |
| 1.6) Neuroendokrine Tumore                                       | 10        |
| 1.6.1) Charakteristika   | 10        |
| 1.6.2) Bronchopulmonale neuroendokrine Tumore (BP-NETs)          | 10        |
| 1.6.2.1) Diagnose  | 11        |
| 1.6.2.2) Therapie  | 12        |
| 1.7) Regulatoren der CXCR4/CXCL12-Achse                          | 13        |
| 1.8) Der CXCR4 als diagnostische und therapeutische Zielstruktur | 14        |
| 1.8.1) Bewertung immunhistochemischer Färbungen                  | 14        |
| 1.8.2) Liganden am CXCR4   | 15        |
| 1.8.3) Klinische Einsatzmöglichkeiten von CXCR4-Liganden         | 17        |
| <b>2) Ziele der Arbeit</b>                                       | <b>18</b> |
| <b>3) Material und Methoden</b>                                  | <b>19</b> |
| 3.1) Chemikalien   | 19        |
| 3.2) Untersuchungsmaterial                                       | 20        |
| 3.3) Antikörper  | 20        |
| 3.4) Antagonisten  | 21        |
| 3.5) Zellkultur  | 22        |
| 3.6) Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem humanen CXCR4       | 22        |
| 3.7) Inkubation der Zellen mit verschiedenen Liganden            | 23        |
| 3.8) Western-Blot-Analyse  | 23        |
| 3.8.1) Rezeptorisolation aus Zellen                              | 23        |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.8.2) Darstellung der Rezeptorproteine mittels SDS-Page und Western-Blot..... | 24        |
| 3.9) Immunzytochemie.....  | 26        |
| 3.10) Immunhistochemie.....  | 27        |
| 3.10.1) Einbettung der Präparate in Paraffin und Entparaffinieren.....         | 27        |
| 3.10.2) Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode .....                                | 28        |
| 3.11) Charakterisierung des UMB-2.....   | 29        |
| 3.11.1) Dot-Blot .....   | 29        |
| 3.11.2) Lambda-Protein-Phosphatase .....                                       | 29        |
| 3.11.3) Peptidneutralisation .....   | 30        |
| 3.12) Bewertung der Färbeintensität der immunhistochemischen Präparate.....    | 30        |
| 3.13) PCR-Analyse der Paraffinschnitte.....                                    | 31        |
| 3.14) Statistische Auswertung.....   | 32        |
| <b>4) Ergebnisse.....</b>  | <b>34</b> |
| 4.1) Darstellung des CXCR4 mit dem phosphosensitiven UMB-2 .....               | 34        |
| 4.2) CXCR4-Expression in verschiedenen Tumoren .....                           | 37        |
| 4.3) Expression des CXCR4 in BP-NETs.....                                      | 38        |
| 4.3.1) Charakterisierung der Patientenstichprobe.....                          | 39        |
| 4.3.2) Immunhistochemische Detektion des CXCR4 .....                           | 39        |
| 4.3.2.1) Typisches Karzinoid (TC).....   | 40        |
| 4.3.2.2) Atypisches Karzinoid (AC) .....                                       | 40        |
| 4.3.2.3) Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC) .....                          | 41        |
| 4.3.3) Statistische Auswertung der CXCR4-Expression.....                       | 42        |
| 4.3.3.1) Ausmaß der CXCR4-Expression in verschiedenen BP-NETs .....            | 42        |
| 4.3.3.2) CXCR4-mRNA-Level in verschiedenen BP-NETs.....                        | 43        |
| 4.3.3.3) Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Level.....                     | 44        |
| 4.3.3.4) Einfluss von Alter und Geschlecht.....                                | 45        |
| 4.3.3.5) Überlebensvariablen .....   | 47        |
| 4.3.3.6) Tumorentität und Überleben .....                                      | 48        |
| 4.3.3.7) CXCR4-Protein-Expression und Überleben .....                          | 48        |
| 4.3.3.8) CXCR4-mRNA-Level und Überleben .....                                  | 49        |
| 4.3.4) Vergleich der immunhistochemischen Auswertungs-Scores.....              | 50        |
| 4.3.5) Cut-off-Werte: Klassifizierung der Auswertungs-Scores .....             | 52        |
| 4.4) Expressionsmuster .....   | 54        |
| 4.5) Expression des CXCR4 in humanen Krebszelllinien .....                     | 56        |
| 4.5.1) Rezeptornachweis.....   | 56        |
| 4.5.2) Antagonisierung des CXCR4.....  | 57        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>5) Diskussion .....</b>  | <b>61</b> |
| 5.1) Eignung des UMB-2 zur Darstellung des CXCR4 .....            | 61        |
| 5.2) Expression des CXCR4 in humanen Krebszelllinien .....        | 62        |
| 5.3) Expression des CXCR4 in Tumoren .....                        | 63        |
| 5.3.1) CXCR4-Expression in verschiedenen Tumorentitäten .....     | 63        |
| 5.3.2) CXCR4-Expression in BP-NETs .....                          | 65        |
| 5.3.3) Membranäre und zytoplasmatische Expression .....           | 69        |
| 5.3.4) Expressionsmuster .....                                    | 70        |
| 5.4) Klinische Nutzbarkeit des CXCR4 .....                        | 72        |
| 5.4.1) Antagonisten und Antikörper .....                          | 72        |
| 5.4.2) Diagnostik von BP-NETs .....                               | 75        |
| 5.4.2.1) Möglichkeiten einer CXCR4-basierten Diagnose .....       | 75        |
| 5.4.2.2) Immunhistochemische Bewertung der CXCR4-Expression ..... | 78        |
| 5.4.3) Pharmakotherapie .....                                     | 79        |
| 5.4.4) CXCR4-abhängige Prognose .....                             | 81        |
| 5.4.4.1) Verschiedene Tumorentitäten .....                        | 81        |
| 5.4.4.2) BP-NETs – Cut-off-Werte .....                            | 83        |
| <b>6) Schlussfolgerungen und Ausblick .....</b>                   | <b>85</b> |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                                | <b>86</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                                  | <b>87</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                                | <b>88</b> |
| <b>Buchstabencodes für Aminosäuren .....</b>                      | <b>90</b> |
| <b>Literaturverzeichnis .....</b>                                 | <b>91</b> |
| <b>Veröffentlichungen und Preise .....</b>                        | <b>IV</b> |
| <b>Lebenslauf .....</b>   | <b>IV</b> |
| <b>Danksagung .....</b>   | <b>V</b>  |
| <b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>                            | <b>VI</b> |

## Zusammenfassung

Das Chemokin CXCL12 und sein Rezeptor, der Chemokinrezeptor CXCR4, vermitteln neben einer Reihe physiologischer auch pathologische Prozesse z.B. im Rahmen der Entstehung und Progression maligner Neoplasien. Die Überexpression des CXCR4 ist hier mit einer schlechten Prognose und verstärkter Metastasierung assoziiert; sie bedingt, dass die Tumorzellen vor allem in Organe, die physiologischerweise einen erhöhten CXCL12-Spiegel aufweisen, migrieren. Eine erhöhte Expression des Rezeptors wurde bereits in einer Vielzahl von Tumorentitäten nachgewiesen. Das verdeutlicht die Attraktivität des Rezeptors als pharmakologische Zielstruktur und erklärt die Vielzahl von bereits synthetisierten CXCR4-Antagonisten, von denen einige kommerziell verfügbar sind und zum Teil bereits in der Klinik erprobt werden.

In Bezug auf bronchopulmonale neuroendokrine Tumore (BP-NETs) wurde die Expression des CXCR4 bisher nur beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC) untersucht und beschrieben, einer Tumorentität, die als sehr aggressiv gilt und eine sehr schlechte Prognose aufweist. Für das typische (TC) und das atypische (AC) Karzinoid wurden bisher keine Daten zur Expression des CXCR4 erhoben. Die Prognose und Behandlungsoptionen dieser Tumorentitäten sind im Vergleich zum SCLC wesentlich besser.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren, BP-NETs und Krebszelllinien mit Hilfe des monoklonalen Kaninchen-anti-CXCR4-Antikörpers UMB-2 unter Verwendung verschiedener Methoden analysiert. Die Expression des CXCR4 innerhalb der BP-NETs wurde zudem auf mRNA-Ebene ermittelt und die Stärke der immunhistochemisch erzeugten Rezeptorfärbung mit Hilfe dreier semi-quantitativer Auswertungssysteme (Immun-Reaktivitäts-Score (IRS), EGFR-Score und Her2neu-Score) erhoben. Bei den Krebszelllinien wurde außerdem die Antagonisierung des CXCR4 durch drei Liganden untersucht.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse sowie immunhistologisch konnte die Eignung des phosphosensitiven UMB-2 zur Darstellung der Gesamtmenge an CXCR4-Rezeptor im histologischen Präparat bestätigt werden. Der CXCR4 ließ sich zudem bei den verschiedenen Tumorentitäten überwiegend an der Zellmembran detektieren. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Färbung der BP-NETs konnte festgestellt werden, dass die Expressionsstärke des CXCR4 in Bezug zur Prognose steht und mit steigender Aggressivität der Tumore zunimmt. So konnte im Gegensatz zu den TC und AC bei nahezu allen SCLC-Präparaten eine sehr hohe Rezeptorexpression detektiert werden. Darüber hinaus korrelierten die CXCR4-mRNA- und Proteinlevel signifikant miteinander. Statistisch ließen sich „Cut-off-Werte“ für die mRNA-Expression, den IRS und den EGFR-Score hinsichtlich einer Differenzierung zwischen einer guten und einer schlechten Prognose für die Patienten ermitteln, die für die klinische Nutzung bedeutsam sein könnten.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate konnten wiederholt spezifische Expressionsmuster festgestellt werden, wie beispielsweise eine, verglichen mit dem umliegenden Tumorgewebe, intensive Immunfärbung einzelner Zellansammlungen, eine erhöhte Rezeptorexpression innerhalb der Proliferationsfronten des Tumors oder im Bereich von Nekrosen. Dies könnte auf eine spezifische Expression des Rezeptors auf Krebsstammzellen (CSCs) oder bei Hypoxie hinweisen.

Der CXCR4 konnte in der vorliegenden Arbeit zum einen in zahlreichen Tumoren nachgewiesen werden, was für die Relevanz des CXCR4 als therapeutische Zielstruktur spricht und zum anderen konnte der Rezeptor auch in verschiedenen Krebszelllinien vorgefunden werden, so dass sich hier ein Ansatzpunkt für die pharmakologische Wirkstoffforschung bietet.

Weiterhin konnte an Krebszelllinien gezeigt werden, dass mit der gleichzeitigen Inkubation des CXCR4 mit dem natürlichen Liganden CXCL12 und einem spezifischen Antagonisten die Phosphorylierung des Rezeptors unterbunden werden kann, d.h. der Rezeptor konnte durch CXCL12 nicht aktiviert werden. Das unterstreicht die Möglichkeit einer diagnostischen, therapeutischen und prognostischen Nutzung des CXCR4, vor allem bei Tumorentitäten, die den CXCR4 sehr stark exprimieren, wie es beim SCLC der Fall ist.

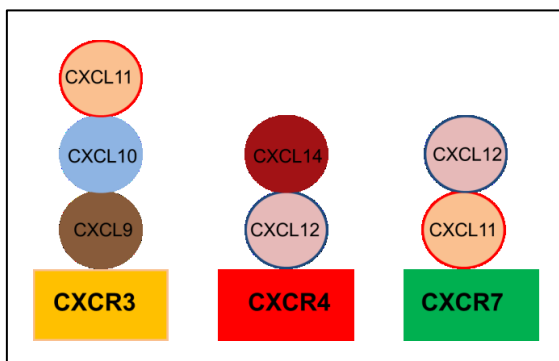
## 1) Einleitung

### 1.1) CXCL12 – ein Chemokin

#### 1.1.1) Chemokine

Chemotaktische Zytokine, kurz: Chemokine, wirken auf andere Zellen wie ein chemischer Lockstoff. Sie bilden eine große Proteinfamilie und sind wichtige Regulatoren in Hinblick auf Zellmigration und Organogenese. Funktionell lassen sie sich zwei großen Wirkungsbereichen zuordnen: Inflammation und Homöostase. Inflammatorische Chemokine locken Leukozyten hin zu Infektionen, Entzündungsherden oder Tumoren. Im Gegensatz dazu lenken homöostatische Chemokine Leukozyten im Zuge der Blutbildung ins Knochenmark und in den Thymus, im Verlauf einer adaptiven Immunantwort in die Milz, die Lymphknoten und in die Peyerschen Plaques des Darms (Moser et al. 2004). Das Chemokin CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokinligand 12) bzw. SDF-1 (stromal cell derived factor 1) ist ein solches homöostatisches Chemokin, dessen Hauptfunktion sowohl die Regulation der Chemotaxis blutbildender Zellen als auch der strukturelle Aufbau sekundär lymphatischer Organe ist (Teicher und Fricker 2010).

Chemokine sind relativ kleine Proteine (7–14 kDa), die einander strukturell sehr ähnlich sind. Es konnten bisher 50 verschiedene Chemokine identifiziert werden, die sich aufgrund der Anzahl und des Abstandes konservierter N-terminaler Cysteinreste in 4 Gruppen einteilen lassen: C, CC, CXC und CXXXC, wobei das C für die Aminosäure (AS) Cystein steht und das X für eine andere AS (Ali und Lazennec 2007, Gangadhar et al. 2010, Guyon 2014, Beck-Sickinger und Panitz 2014, Rollins 1997).



**Abb. 1:** Die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR7 und ihre endogenen Liganden.

CXCL11 bindet sowohl an den CXCR3 als auch an den CXCR7. CXCL12 ist ein endogener Ligand am CXCR4 und am CXCR7. CXCL14 zählte bis 2013 zu den Orphan-Chemokinen, die Gruppe um Tanegashima zeigte jedoch eine starke Bindungsaffinität an den CXCR4 (Tanegashima et al. 2013).

Abbildung modifiziert nach Zlotnik (Zlotnik et al. 2006).

Mit dem freien N-Terminus, dem dreifachen  $\beta$ -Faltblatt und der C-terminalen  $\alpha$ -Helix weisen Chemokine eine hoch konservierte Tertiärstruktur auf (Beck-Sickinger und Panitz 2014).

Chemokine entfalten ihre physiologische Wirkung über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), wobei die meisten Chemokine an verschiedene Rezeptoren binden können und auch viele Rezeptoren mehrere Chemokine erkennen (Bacon und Harrison 2000, Zlotnik et al. 2006). In Abbildung 1 sind die Chemokinrezeptoren CXCR3 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CD183), CXCR4 (CD184) und

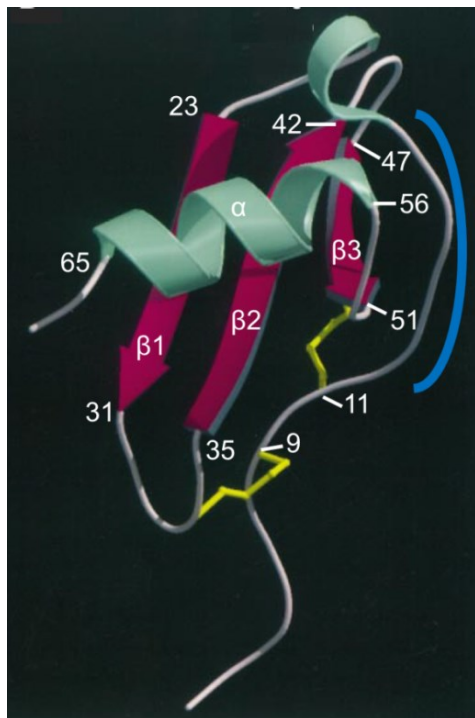


CXCR7 (RDC1) mit den an sie bindenden Chemokinen CXCL11 (I-TAC: Interferon inducible T-cell Chemoattractant), CXCL12 und CXCL14 grafisch dargestellt.

### 1.1.2) Das Chemokin CXCL12

CXCL12 wurde erstmals als Sekretionsprodukt einer stromalen Knochenmarkszelllinie beschrieben (Tashiro et al. 1993). Es wird konstitutiv von verschiedenen Geweben bzw. Organen, wie Knochen, Lunge oder Leber, exprimiert bzw. sezerniert (Furusato et al. 2010) sowie vom Endothel und durch Stromazellen freigesetzt (Faber et al. 2007, Woodard und Nimmagadda 2011).

CXCL12 ist ein multifunktionales Chemokin, das zum einen als proinflammatorischer Mediator und zum anderen als ein potenter Lockstoff für T-Zellen, Monozyten und lymphohämatopoetische Progenitorzellen fungiert. Obgleich die Expression der meisten Chemokine durch Zytokine induziert wird, wird CXCL12 konstitutiv exprimiert (Crump et al. 1997).



**Abb. 2:** Darstellung der regulären Hauptstruktur von CXCL12α.

Pink: β-Faltblatt; türkis: α-Helix; grau: Helix-Schleifen; gelb: Disulfidbrücken. Zahlen geben die jeweilige AS-Position innerhalb des Peptides an. Die blaue Klammer markiert den Bereich, in dem sich der RFFESH-Loop (AS 12-17) befindet.

Abbildung verändert nach Crump et al., (1997) und Gozansky et al., (2005).

CXCL12 kann in sechs verschiedenen Isoformen auftreten: CXCL12α – ε und φ, die sich aufgrund der Anzahl zusätzlicher Aminosäuren am C-Terminus voneinander unterscheiden.

CXCL12α, das für die Versuche in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, besteht aus 68 Aminosäuren (Wong und Korz 2008). Es zeigt die für Chemokine typische Faltung mit dem unstrukturierten N-Terminus (K1-Y7) und dem sich anschließenden langen und flexiblen Loop (vgl. Abb. 2) (Kofuku et al. 2009).

CXCL12 war lange Zeit der einzige bekannte Ligand am CXCR4. 2013 zeigte die Arbeitsgruppe um Tanegashima, dass das Orphanchemokin CXCL14, ein Chemokin, dessen Rezeptor noch nicht gefunden wurde, mit großer Affinität an den CXCR4 bindet und als Antagonist fungiert (Tanegashima et al., 2013). Otte et al. (2014) konnten jedoch nicht bestätigen, dass CXCL14 ein funktioneller Ligand des CXCR4 ist (Otte et al. 2014).

## 1.2) Der CXCR4 – ein Chemokinrezeptor

### 1.2.1) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden die größte Familie membrangebundener Rezeptoren und sind dementsprechend in nahezu alle physiologischen Prozesse involviert (Wong et al., 2008)

GPCRs durchspannen die Zellmembran mit sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen. Diese sind durch extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. Die extrazellulär gelegene N-terminale Region ist für die Bindung der Liganden von Bedeutung (Venkatakrishnan et al. 2014, Lagerstrom und Schioth 2008), dennoch kann die Ligandenbindung generell im gesamten extrazellulären Bereich und potentiell auch an intrazellulären oder intra-membranären Stellen erfolgen (Wang und Lewis 2013).

Die Bindung des Liganden bewirkt eine zweistufige Konformationsänderung des Rezeptors, die zur Dissoziation des intrazellulär gebundenen heterotrimeren Guanin-Nukleotid-bindenden Proteins (G-Protein) führt, wobei das am G-Protein gebundene GDP (Guanosindiphosphat) gegen ein GTP (Guanosintriphosphat) ausgetauscht wird, was zur Dissoziation der  $\alpha$  ( $G\alpha$ )- und  $\beta\gamma$  ( $G\beta\gamma$ )-Untereinheiten führt, die dann mit weiteren Effektorproteinen interagieren (Wang und Lewis 2013, Hurowitz et al. 2000, Teicher und Fricker 2010).

GPCRs vermitteln eine zelluläre Antwort auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen, wie zum Beispiel Hormone, Neurotransmitter oder Chemokine, indem intrazelluläre Signalkaskaden mit Hilfe von Effektorproteinen, wie G-Proteinen oder  $\beta$ -Arrestinen, ausgelöst werden (Venkatakrishnan et al. 2014, Shukla et al. 2014, Zhu et al. 2013).

Die Gene der  $\alpha$ -Untereinheit werden, basierend auf ihrer Sequenzhomologie, Genstruktur und Regulation von Effektorproteinen, in vier Klassen unterteilt, zu denen verschiedene Mitglieder zählen (vgl. Tab. 1):  $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$  und  $G_{12}$  (Hurowitz et al. 2000). Außerdem wurde 2009 eine fünfte Klasse definiert:  $G_v$ , die allerdings nicht im menschlichen Organismus vorkommt (Oka et al. 2009).

**Tab. 1:** Klassen der Untereinheiten und Effektorproteine von  $G\alpha$ -Proteinen (Teicher und Fricker 2010, Sanchez-Fernandez et al. 2014, Simon et al. 1991).

| Klasse                     | Untereinheiten   | Effektorproteine   |
|----------------------------|--|--|
| <b><math>G_s</math></b>    | $G\alpha_s$ , $G\alpha_{olf}$  | Aktivierung der Adenylatzyklase (AC)   |
| <b><math>G_i</math></b>    | $G\alpha_{i2}$ , $G\alpha_{i3}$ , $G\alpha_{i1}$ , $G\alpha_o$ , $G\alpha_z$ , $G\alpha_t$ | Inhibierung der AC   |
| <b><math>G_q</math></b>    | $G\alpha_{15}$ , $G\alpha_{16}$ , $G\alpha_{14}$ , $G\alpha_{11}$ , $G\alpha_q$            | Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$ (PLC $\beta$ ), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) |
| <b><math>G_{12}</math></b> | $G\alpha_{12}$ , $G\alpha_{13}$  | Aktivierung monomerer G-Proteine (Rho, Ras)  |

### **1.2.2) Chemokinrezeptoren**

Chemokinrezeptoren zählen zur Klasse A der Proteinfamilie der GPCRs (Wong et al. 2008). Sie sind wichtige Regulatoren der Zellmigration im Rahmen von Immunantworten, Entzündungsreaktionen oder körperlicher Entwicklung (Zhu et al. 2013). Gegenwärtig sind 19 verschiedene humane Chemokinrezeptoren bekannt. Die Bindung des spezifischen Chemokin-Liganden an den Rezeptor erhöht den intrazellulären Calciumspiegel, so dass sich mit der Homöostase oder mit einer Inflammation verknüpfte Signalkaskaden anschließen können (Zhu et al. 2013).

### **1.2.3) Der Chemokinrezeptor CXCR4**

Der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (CXCR4, CD184) wurde nach seiner Entdeckung 1993/1994 zunächst als LESTR (leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor) bezeichnet. Es war bereits bekannt, dass er bei der Aktivierung inflammatorischer Zellen involviert ist (Crump et al. 1997, Loetscher et al. 1994). Seinen jetzigen Namen erhielt der Rezeptor, den Konventionen der Namensgebung von Chemokinrezeptoren folgend, nachdem das Chemokin CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokinligand 12) bzw. SDF-1 (stromal cell derived factor-1) 1996 als endogener Ligand am Rezeptor identifiziert wurde (Crump et al., 1997). Im gleichen Jahr wurde auch entdeckt, dass der CXCR4 als Co-Rezeptor für das HI-Virus (Human Immunodeficiency Virus) fungiert (Feng et al. 1996).

Der CXCR4 wird vor allem auf Lymphozyten exprimiert, wie beispielsweise B- und T-Zellen und Granulozyten, aber auch auf einigen anderen Zelltypen wie Endothel- und Epithelzellen. Außerdem tritt der CXCR4 innerhalb einiger Organe verstärkt auf; dazu zählen Gehirn, Lunge, Kolon, Herz, Leber und Nieren (Teicher und Fricker 2010, Weitzenfeld und Ben-Baruch 2014).

Strukturell weist der CXCR4 die klassische Struktur von GPCRs auf. Zusätzlich besitzt er zwei extrazellulär gelegene Disulfidbrücken; eine verbindet die Basis des N-Terminus (Cys28) mit Helix sieben (Cys274), diese beiden Cysteine sind übrigens in allen Chemokinrezeptoren, ausgenommen CXCR5 und CXCR6, konserviert. Die zweite Disulfidbrücke verbindet die 3. Helix (Cys109) mit der zweiten extrazellulären Schleife (Cys186). Beide Disulfidbrücken und die dadurch entstehende Orientierung des extrazellulären Bereichs sind für die Ausbildung einer optimalen Ligandenbindungstasche bedeutsam (Wu et al. 2010).

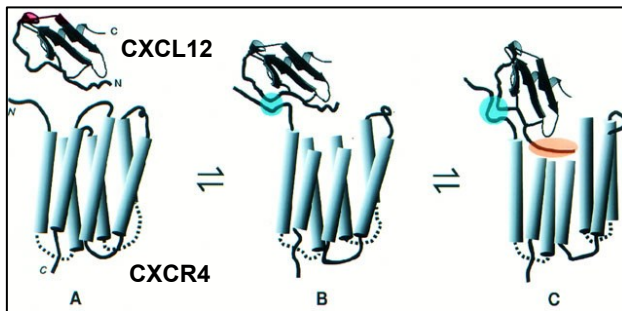
### **1.3) Bindung von CXCL12 an den CXCR4 und Signaltransduktion**

Die Migration von Leukozyten aufgrund einer Stimulation durch Chemokine wird über zwei konservierte funktionelle Regionen innerhalb des N-terminalen Bereichs des jeweiligen Chemokins bewerkstelligt, wovon eine die Rezeptorbindung bewirkt und die andere die

Bindung an die Zelloberfläche oder die extrazelluläre Matrix (Moser et al. 2004). Zusätzlich scheint aber auch die  $\beta$ -Faltblattstruktur eine Rolle bei der Rezeptorbindung zu spielen (Xu et al. 2013b).

### 1.3.1) Bindungsmodus

Verschiedene Autoren gehen von einem zweistufigen Bindungsmodus bei der CXCL12-CXCR4-Interaktion aus (Crump et al. 1997, Kofuku et al. 2009, Xu et al. 2013b). Crump et al. (1997) konnten mit Hilfe verschiedener CXCL12-Chimären und Radioligand-Bindungsstudien zeigen, dass der sogenannte RFFESH-Loop (AS 12-17) neben den N-terminalen AS (AS 1-8) die CXCL12-Bindung an den Rezeptor und entsprechend dessen Aktivierung bestimmt. So konnten sie zeigen, dass die Deletion der ersten AS bzw. der Austausch einzelner N-terminaler AS im CXCL12 dazu führt, dass nach Rezeptorbindung kein oder nur ein vermindertes CXCR4-Signal ausgelöst wird (Crump et al. 1997). Die nachfolgende Abbildung 3 zeigt das Modell der Rezeptoraktivierung nach Crump et al. (1997).



**Abb. 3:** Modell der CXCL12-Bindung an den CXCR4 nach Crump et al. (1997).

**A:** Rezeptor und Ligand vor der Bindung. **B:** CXCL12 bindet mit dem RFFESH-Loop an den N-terminalen Bereich (N) des CXCR4 (blau: Kontaktbereich). Aufgrund der Bindung werden zwei der Rezeptorhelices verkürzt, was die Öffnung der Bindungstasche bewirkt. **C:** Bindung der N-terminalen CXCL12-Region an den oberen Teil der Helices des CXCR4 führt zu dessen Aktivierung und einer weiteren Konformationsänderung.

Kofuku et al. (2009) gehen ebenfalls von einem zweistufigen Bindungsmodus aus. Ihre Vorstellungen unterscheiden sich jedoch von Crump et al. (1997) insofern, als dass sie in der  $\beta$ -Faltblattstruktur, dem 50s-Loop und dem N-Terminus des CXCL12 entscheidende Strukturen für eine Bindung an die extrazellulären Regionen des CXCR4 sehen. Die eben genannten Strukturen bedingen den ersten Schritt der Rezeptoraktivierung, da sie das effiziente Andocken von CXCL12 an den CXCR4 ermöglichen. Der N-Terminus des CXCL12 ist nach dieser Bindung des CXCL12 an den Rezeptor hoch dynamisch, so dass die innerhalb der CXCR4-Transmembranhelices gelegene Bindungstasche effizient gefunden werden kann, was zur Auslösung des G-Protein-Signals führt (Kofuku et al. 2009). Auch Xu et al. (2013) gehen von einer zweistufigen Bindung von CXCL12 an den CXCR4 aus, wobei diese durch das jeweils verschiedene elektrostatische Potential der Bindungspartner beeinflusst wird. Demnach weisen die N-terminalen Seitenketten und die extrazellulären Schleifen des CXCR4 ein stark negatives, CXCL12 oder Antagonisten, wie bei-

spielsweise das AMD3100, jedoch ein stark positives Potential auf. Xu et al. (2013) schließen anhand ihrer Daten darauf, dass die Transmembrandomänen 5 und 6 die entscheidenden Vermittler für das Auslösen des G-Protein-Signals sind. In der Analyse potentieller Wechselwirkungen zwischen Rezeptor und Ligand sehen sie die Grundlage für eine strukturbasierte Herstellung von CXCR4-Liganden (Xu et al. 2013b).

### **1.3.2) Intrazelluläre Signaltransduktion des CXCR4**

Es wird davon ausgegangen, dass nach der Bindung von CXCL12 an den CXCR4 eine Dimerisierung des Rezeptors stattfindet, die Voraussetzung für die sich anschließenden Signalkaskaden ist (Wong und Korz 2008). Durch sie werden Chemotaxis und/oder Proliferation und die Transkription von Genen, die mit dem Zellüberleben assoziiert sind, ausgelöst (Teicher und Fricker 2010).

Mit der Dissoziation und dem Zerfall des trimeren G-Proteins nach Ligandenbindung werden verschiedene Signalwege angeschaltet und andere, wie die Adenylatzyklase, gehemmt. Durch das  $G\alpha_i$  wird unter anderem die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiviert, was Überleben, Proliferation, Chemotaxis und Gentranskription der Zelle zur Folge hat. Das  $G\beta\gamma$  führt zur Aktivierung der Phospholipase C- $\beta$  und entsprechend der Proteinkinase C, wodurch eine Chemotaxis ausgelöst wird. Die durch die Ligandenbindung induzierte Rezeptorphosphorylierung wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) vermittelt. Sie führt einerseits zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und andererseits zur  $\beta$ -Arrestin-vermittelten Endocytose des Rezeptors in Clathrin-beschichteten Vesikeln (Teicher und Fricker 2010). Diese Vesikel verschmelzen zum Endosom. Von dort wird der Rezeptor recycelt oder dem lysosomalen Abbau zugeführt. Die spezifische Phosphorylierung und damit verbundene Ubiquitinylierungen des CXCR4 beeinflussen das Rezeptorschicksal (Marchese 2014).

### **1.4) Die CXCR4-CXCL12-Achse**

Die funktionelle Expression des CXCR4 auf verschiedenen Zelltypen, z.B. Lymphozyten, erlaubt ihnen die Migration entlang eines CXCL12-Gradienten (Teicher und Fricker 2010). Für die Hämatopoese und die Entwicklung des Organismus im Rahmen der Embryogenese ist die CXCR4-CXCL12-Achse ebenfalls essentiell (Nagasawa 2014).

Der CXCR4 wird auf hämatopoetischen Stammzellen exprimiert, aus denen alle Blutzellen hervorgehen. Während ihrer Entwicklung und dementsprechend in der Ontogenese migrieren sie und die aus ihnen hervorgegangenen Progenitorzellen ins Knochenmark, bedingt durch den dort vorherrschenden hohen CXCL12-Spiegel. Die B-Zell-Entwicklung aus Vorläuferzellen und das Homing reifer B-Zellen und Plasmazellen in Knochenmark,

Lymphknoten und Peyerische Plaques sind ebenfalls von der CXCR4-CXCL12-Achse abhängig (Nagasawa 2014).

Während der Embryogenese siedeln sich primordiale Geschlechtszellen CXCR4/CXCL12-vermittelt in den Gonaden an, bei der Entwicklung der Herzscheidewand und der Vaskularisierung des Gastrointestinaltrakts, der Haut und der Nieren spielt die CXCR4-CXCL12-Achse ebenfalls eine Rolle. Während der Neurogenese beeinflusst das CXCL12 die Proliferation, Migration und die Wuchsbahnen von Axonen verschiedener Typen unreifer Neuronen (Nagasawa 2014).

### **1.5) CXCR4 und CXCL12 in Neoplasien**

In pathophysiologischer Hinsicht wird Chemokinen allgemein eine essentielle Rolle in der Tumorentstehung zugeschrieben, indem sie u.a. eine Angiogenese induzieren und das Tumorstadium erleichtern. Sie können dabei auto- oder parakrin wirken (Ghanem et al. 2014, Teicher und Fricker 2010). Die durch die CXCL12-Bindung an den CXCR4 ausgelösten Signalwege und das physiologische Vorkommen von Ligand und Rezeptor bedingen deren Wirkung in Neoplasien: Proliferation und Metastasierung.

In einer Vielzahl von Studien konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte CXCR4-Expression mit einer verstärkten Metastasierung, Angiogenese und Proliferation der Tumorzellen sowie mit therapeutischer Resistenz einhergeht (Chatterjee et al. 2014, Dillenburg-Pilla et al. 2014, Weiss und Jacobson 2013). Eine übermäßige Expression des CXCR4 konnte bisher bei 23 verschiedenen Tumorarten gezeigt werden (Balkwill 2004a). Neben dem CXCR4 scheint auch die Expression von CXCL12 durch die Tumorzellen selbst eine Rolle zu spielen. Es existiert eine Reihe von Studien, die eine Expression von CXCL12 innerhalb verschiedener Tumore beschreibt (Ilhan et al. 2009, Sun et al. 2014, Berghuis et al. 2012, Pils et al. 2007). Ebenso wie eine erhöhte CXCR4-Expression ist auch ein erhöhter CXCL12-Spiegel innerhalb einer Neoplasie mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Izumi et al. 2014). Imai und Kollegen (2010) fanden bei zahlreichen Lungenkrebszelllinien eine endogene CXCL12-Expression und konnten deren Einfluss auf die Proliferation und Migration der Zellen zeigen. Außerdem stellten sie eine wesentlich höhere CXCL12-Expression in Tumoren, verglichen mit gesundem Gewebe, fest, die zudem mit der Expression des CXCR4 und des CXCR7 korrelierte (Imai et al. 2010). Dass nicht per se ein hoher CXCL12-Spiegel innerhalb eines Tumors herrschen muss, zeigte die Arbeitsgruppe von Sun (2014). Sie konnten nur bei 27,4% (50/182) der von ihnen immunhistochemisch untersuchten Brusttumore eine Ko-Expression von CXCR4 und CXCL12 feststellen (Sun et al. 2014).

## **1.6) Neuroendokrine Tumore**

### **1.6.1) Charakteristika**

Neuroendokrine Tumore (NETs) haben ihren Ursprung im diffusen neuroendokrinen System (Ameri und Ferone 2012) und bilden eine heterogene Gruppe von Neoplasien, die in nahezu allen Organen auftreten können (Yao et al. 2008). Zwei Drittel aller NETs treten im gastroenteropankreatischen System auf und werden als GEP-NETs bezeichnet (Lawrence et al. 2011). Je nachdem, ob vom Tumor Hormone sezerniert werden oder nicht, wird er klinisch als funktionell oder nicht-funktionell eingestuft (Modlin et al. 2008).

Die Unterteilung in gut- und schlecht differenzierte neuroendokrine Neoplasien (NENs) wird basierend auf der Struktur von Intermediärfilamenten und der Produktion von Peptidhormonen und/oder biogenen Aminen getroffen. Schlecht differenzierte neuroendokrine Karzinome (NEKs) sind sehr aggressiv und letal, gut differenzierte NETs sind in der Regel jedoch weniger aggressiv und zeigen eine geringere Metastasierung. Beide Gruppen weisen morphologische Gemeinsamkeiten, aber auch Unterschiede auf. Schlecht differenzierte NETs bestehen aus kleinen, mittleren oder großen Zellen, deren Wachstumsmuster häufig diffus sind. Bei gut differenzierten NETs kann unabhängig von der Lokalisation eine charakteristische Zellanordnung gefunden werden, die als organoid bezeichnet wird und häufig fein granulierte Zellkerne aufweist (Bellizzi 2013).

### **1.6.2) Bronchopulmonale neuroendokrine Tumore (BP-NETs)**

BP-NETs umfassen etwa 20% aller Lungentumore. Gemeinsam sind ihnen strukturelle, morphologische, immunhistochemische und ultrastrukturelle Merkmale, auf deren Grundlage sie in vier Subgruppen unterteilt werden können: Typische Karzinoide (TC), Atypische Karzinoide (AC), großzellige neuroendokrine Karzinome (LCNEC) und kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC) (Gustafsson et al. 2008). Die nachfolgende Tabelle 2 gibt wichtige Definitionsmerkmale und Charakteristika dieser Tumore wieder.

Das AC nimmt eine intermediäre Position zwischen TC und SCLC ein. Während beim TC vergleichsweise wenige Mitosen und ein sehr langsames Wachstum charakteristisch sind, kann beim AC eine höhere Mitoserate festgestellt werden, die jedoch geringer als beim SCLC oder LCNEC ist. Wie sich das AC klinisch manifestiert, ist von der jeweiligen Mitoserate und der daraus resultierenden Proliferationsrate abhängig (Horsch et al. 2012).

Bei der Erstdiagnose ist das AC im Gegensatz zum TC häufig bereits metastasiert und zeigt generell eine höhere Metastasierungswahrscheinlichkeit (Naalsund et al. 2011, Ferolla et al. 2009). Demgegenüber sind SCLC und LCNEC als sehr aggressive Neoplasien einzustufen, die mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert sind (Naalsund et al. 2011, Luchtenborg et al. 2014).

**Tab. 2:** Kriterien von BP-NETs  
(Gustafsson et al. 2008, Naalsund et al. 2011).

|   | <b>TC</b>               | <b>AC</b>                     | <b>SCLC</b>             | <b>LCNEC</b>            |
|---|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>% aller Lungentumore</b>                     | 2-3                     | 0,1-0,2                       | 10                      | <1                      |
| <b>Wachstumsge-<br/>schwindigkeit</b>           | Langsam                 | Weniger lang-<br>sam          | Schnell                 | Schnell                 |
| <b>Größe<br/>(Durchmesser in mm)</b>            | >5                      | >5                            |                         |                         |
| <b>Differenzierung</b>                          | Low-grade:<br>gut       | Intermediate-<br>grade: mäßig | High-grade:<br>schlecht | High-grade:<br>schlecht |
| <b>Lokalisation</b>                             | Tendenziell<br>peripher | Zentral                       |                         |                         |
| <b>Mitosen (WHO):<br/>Anzahl/mm<sup>2</sup></b> | <2                      | 2-10                          | >10                     | >10                     |
| <b>Nekrosen</b>                                 | Nein                    | Punktuell                     | Häufig groß-<br>flächig | Häufig groß-<br>flächig |
| <b>Zellmorphologie</b>                          |                         |                               | Klein, rund             | Polygonal,<br>lang      |
| <b>Prognose:<br/>5-Jahres-Überleben</b>         | 88%                     | 50%                           | < 5%                    | 15-57%                  |

Eine histopathologische Unterscheidung zwischen AC und SCLC ist sehr schwierig, insbesondere wenn das AC schlecht differenziert und/oder stark proliferativ ist (Siddiqui 2010).

Die Zuordnung der TNM-Klassifikation (T=Tumor, N=Nodes (Lymphknoten), M=Metastase), einem System zur Beurteilung maligner Neoplasien, zu den jeweiligen Tumoren zeigt, dass Wachstumsgeschwindigkeit, Differenzierung und Grading der Tumore mit dem Auftreten von Fern- und Lymphknotenmetastasen korrelieren (Fink et al. 2001, Gustafsson et al. 2008, Wang et al. 2014a). Eine erhöhte Expression des CXCR4 wird in vielen Studien für SCLC beschrieben (Li et al. 2014, Gangadhar et al. 2010, Teicher 2014, Otani et al. 2012).

### **1.6.2.1) Diagnose**

Generell stehen für die immunhistochemische Diagnostik verschiedene Marker zur Verfügung, die routinemäßig zur Unterscheidung zwischen kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom verwendet werden (Zheng et al. 2013).

Die Diagnostik von TC und AC beruht auf der Nutzung verschiedener neuroendokriner Marker, wie Chromogranin A, CD56 und Synaptophysin. Die Färbung gegen Ki-67, einem Proliferationsmarker, erlaubt eine Abgrenzung von TC und AC gegenüber SCLC. Der Thyroid-Transkriptionsfaktor 1 fungiert zusätzlich als ein diagnostisches Kriterium, das bei 70-80% aller SCLC positiv ist (Travis 2010, Pelosi et al. 2005, Sturm et al. 2002). Den-



noch ist die Unterscheidung zwischen kleinzelligem und nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom schwierig, so dass Fehldiagnosen getroffen werden (Travis 2010).

Außerdem werden histologische Merkmale wie Mitoserate und Auftreten von Nekrosen herangezogen, da sich die BP-NETs in dieser Hinsicht unterscheiden (Sayeg et al. 2014, Gustafsson et al. 2008, Naalsund et al. 2011).

Neben der Labordiagnostik stehen eine Reihe bildgebender Verfahren wie beispielsweise Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) oder Bronchoskopie zur Verfügung (Sayeg et al. 2014). Bei einer Szintigrafie, basierend auf der Bindung zwischen Rezeptor und radioaktiv markiertem Rezeptorligand, fängt eine Gamma-Kamera die beispielsweise vom  $^{111}\text{Indium}$ , das an den Liganden gebunden ist, emittierten Gammastrahlen ein und visualisiert sie. Diese Methode wird bereits seit 1987 in der Diagnostik von NETs verwendet, da diese Tumore verschiedene Somatostatin-Rezeptoren überdurchschnittlich stark exprimieren (Sayeg et al. 2014). Im Vergleich zur Szintigrafie erlaubt die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT, *engl.* single photon emission computed tomography) neben Aussagen zur Expressionsstärke und Größe der Zielstruktur auch Angaben über deren Lage, da gleichzeitig mehrere Gamma-Kameras zum Einsatz kommen, die die emittierte Strahlung aus verschiedenen Raumrichtungen detektieren, wodurch ein dreidimensionales Bild erzeugt wird. Das SPECT-CT als eine Kombination von SPECT und CT liefert spezifischere Ergebnisse und ist vergleichsweise sensitiver (Mortensen und Gutte 2014).

#### **1.6.2.2) Therapie**

In Abhängigkeit von der Tumorentität und dem Stadium der Erkrankung stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Eine chirurgische Resektion ist die Therapie der ersten Wahl bei Karzinoiden. Sie zielt auf eine vollständige Entfernung des Tumors und die Erhaltung einer möglichst großen Menge funktionellen Lungengewebes ab (Sayeg et al. 2014). Bei high-grade Neoplasien werden chirurgische Maßnahmen kontrovers diskutiert (Cooper et al. 2001). Takenaka et al. (2015) konnten in ihrer sehr umfangreichen, über 4 Dekaden (1970er bis 2000er Jahre) gehenden Studie an Patienten mit SCLC zeigen, dass sich das kumulative Überleben der Patienten über die Jahrzehnte verbessert hat. Außerdem konnten sie, so wie die Cooper und Kollegen (2001) ebenfalls den Benefit einer Resektion, vorausgesetzt sie findet in einem frühen klinischen Stadium statt, aufzeigen (Cooper et al. 2001, Takenaka et al. 2015). Weitere Behandlungsmöglichkeiten sind die Chemotherapie, beispielsweise mit Cisplatin und Spindelgiften, die Gabe von Somatostatinanaloga bei funktionellen NETs und die Interferontherapie (Sayeg et al. 2014).

Welche Therapieform genutzt wird, ist von der jeweiligen Diagnose und dem Stadium der Erkrankung abhängig.

## 1.7) Regulatoren der CXCR4/CXCL12-Achse

### *Chemokinrezeptor CXCR7*

Das CXCL12 bindet neben dem CXCR4 auch an den Chemokinrezeptor CXCR7 (Balabanian et al. 2005, Burns et al. 2006). Das Chemokin CXCL11 ist ein weiterer endogener Ligand am CXCR7, bindet aber im Vergleich zu CXCL12 mit 10fach niedrigerer Affinität an den Rezeptor (Burns et al. 2006, Hattermann et al. 2010). Obwohl der CXCR7 in CXCL12-vermittelte physiologische Prozesse, wie beispielsweise in die Herzentwicklung (Gerrits et al. 2008, Klein et al. 2014) oder in die neuronale Entwicklung (Schonemeier et al. 2008) involviert ist, wird davon ausgegangen, dass keine G-Proteingekoppelte Signalweiterleitung, sondern ein  $\beta$ -Arrestin-vermitteltes Signaling stattfindet (Rajagopal et al. 2010, Decaillot et al. 2011). Dem CXCR7 wird zudem eine regulatorische Funktion hinsichtlich des freien und verfügbaren CXCL12 zugeschrieben, indem er dieses wegfängt und somit dessen Bindung an den CXCR4 verhindern bzw. regulieren soll (Naumann et al. 2010, Luker et al. 2012). Das CXCL12 bindet mit 10fach höherer Affinität an den CXCR7 als an den CXCR4 (Balabanian et al. 2005, Crump et al. 1997).

Eine erhöhte Expression des CXCR7 wurde bei Krebszelllinien und verschiedenen Tumoren, beispielsweise Gliomen, Adenokarzinomen des Pankreas, Prostatakarzinomen oder Blasenkarzinomen, nachgewiesen (Miao et al. 2007, Gebauer et al. 2011, Hattermann et al. 2010, Wang et al. 2008, Hao et al. 2012). Die funktionelle Bedeutung des CXCR7 bei Neoplasien wird in der Literatur jedoch kontrovers diskutiert. Einerseits wird ein erhöhtes Tumorwachstum beschrieben (Miao et al. 2007, Yates et al. 2013), andererseits ein protektiver Effekt, der zu einem geringeren Tumorwachstum führt (Liberman et al. 2012, Luker et al. 2012).

### *Dimerisierungen*

Das dimere oder auch oligomere Auftreten von GPCRs weist vor allem innerhalb der mitgliederstarken Klasse A auf eine sehr komplexe Situation hin (Milligan 2013). Die funktionale Komplexität von GPCRs spricht für die konstitutive Oligomerisation dieser Rezeptoren (Wang und Lewis 2013). Chemokinrezeptoren können in dimerer und monomerer Form auftreten (Scholten et al. 2012), wobei auch Heteromere, beispielsweise zwischen CXCR4 und CXCR7 bzw. CXCR4 und CXCR3, gebildet werden können (Luker et al. 2009, Levoye et al. 2009, Decaillot et al. 2011, Watts et al. 2013). Durch eine Heterodimerisierung von beispielsweise CXCR4 und -7 wird die CXCR4-G-Protein-Bindung durch den CXCR7 funktionell moduliert, was eine erhöhte Chemotaxis der Zellen bedingt (Decaillot et al. 2011, Levoye et al. 2009).

### *Tumormikromilieu: Hypoxie*

Eine Hypoxie tritt bei der Mehrzahl aller soliden Tumore auf. Aufgrund der hohen Proliferationsrate durchwachsen die Zellen das umgebende Gefäßsystem und vermindern so den verfügbaren Sauerstoffgehalt auf unter 2% (Bertout et al. 2008).

Wenn ein Tumor die Größe von 2 mm überschreitet, werden die Bedingungen innerhalb des Tumors hypoxisch. Eine Angiogenese, die durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Hypoxie-induzierter-Faktor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), der die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren stimuliert, ausgelöst wird, ist eine Antwort darauf (Munoz-Guerra et al. 2009, Jin et al. 2012).

Viele Studien zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression des CXCR4 und hypoxischen Bedingungen, wobei das HIF-1 $\alpha$  als Mediator für eine gesteigerte CXCR4-Expression diskutiert wird, die wiederum mit Metastasierungsprozessen assoziiert ist (Guan et al. 2015, Su et al. 2014, Guo et al. 2014, Munoz-Guerra et al. 2009). Dem HIF-1 $\alpha$  wird eine Schlüsselrolle hinsichtlich der zellulären Reaktion auf Hypoxie zugeschrieben und eine regulatorische Funktion in Bezug auf das Tumorwachstum (Munoz-Guerra et al. 2009). Andere Autoren wiederum konnten keinen Zusammenhang zwischen einer Hypoxie und der Expression des CXCR4 feststellen (Berghuis et al. 2012).

## **1.8) Der CXCR4 als diagnostische und therapeutische Zielstruktur**

### **1.8.1) Bewertung immunhistochemischer Färbungen**

Für die Bewertung einer immunhistochemisch erzeugten Färbung stehen verschiedene semi-quantitative Bewertungssysteme zur Verfügung, mit deren Hilfe die Intensität und die Ausdehnung einer bestimmten gefärbten Struktur innerhalb von Neoplasien bzw. Geweben allgemein numerisch erfasst werden kann. Ein Zahlenwert, der die Stärke der Färbung wiedergibt, kann der Standardisierung von Diagnose und Therapie dienen.

Der **Immunreaktivitäts-Score** (immunoreactivity score, **IRS**), in Anlehnung an Remmele und Stegner, berücksichtigt sowohl die Intensität der Färbung als auch den Prozentsatz der Zellen, die ein positives Immunsignal zeigen. Er errechnet sich aus dem Produkt des Wertes, der die stärkste Intensität der Färbung angibt und dem Wert, der den Prozentsatz aller gefärbten Zellen wiedergibt: **IRS = Wert (Intensität der Färbung) x Wert (Prozentsatz gefärbter Zellen)**. Der Intensität der Färbung werden Werte zwischen null und drei zugeordnet, der Anteil der gefärbten Zellen wird mit Werten zwischen null und vier beurteilt. Folglich können Werte zwischen 0 und 12 erreicht werden. Der Score wurde ursprünglich für die Bewertung der Expression von Oestrogen- und Progesteronrezeptoren bei Brustkrebs entwickelt (Remmele und Stegner 1987).

Die Berechnung des **EGFR-Scores** (EGFR: epidermal growth factor receptor) berücksichtigt die genaue prozentuale Anzahl der gefärbten Zellen und die Intensität der Färbung,

die zur Gewichtung der gefärbten Zellen genutzt wird: **EGFR = (1 (% Zellen 1+) + 2 (% Zellen 2+) + 3 (% Zellen 3+))**. 1+, 2+, 3+ geben die Intensität der Membranfärbung an. Dementsprechend kann die Intensität der Färbung einen Wert zwischen Null und 300 erreichen (Pirker et al. 2012). Dieses Bewertungssystem wurde erstmals zur Erfassung der EGFR-Expression bei nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen genutzt (Hirsch et al. 2003).

Beim **Her2/neu-Score** (HER2: human epidermal growth factor receptor 2) wird eine positive Farbreaktion nur erfasst, wenn diese bei mindestens 10% der Zellen festzustellen ist. Die Färbeintensität (0: negativ – 3: stark positiv) dieser mindestens 10% gefärbten Zellen bestimmt die Bewertung des Präparates. Dementsprechend wird eine Überexpression der Zielstruktur nur durch die Werte 2 und 3 ausgedrückt. Der Score wurde initial entwickelt, um die Bewertung der HER2-Expression bei Mammakarzinomen zu standardisieren (Tsuda et al. 2001).

### 1.8.2) Liganden am CXCR4

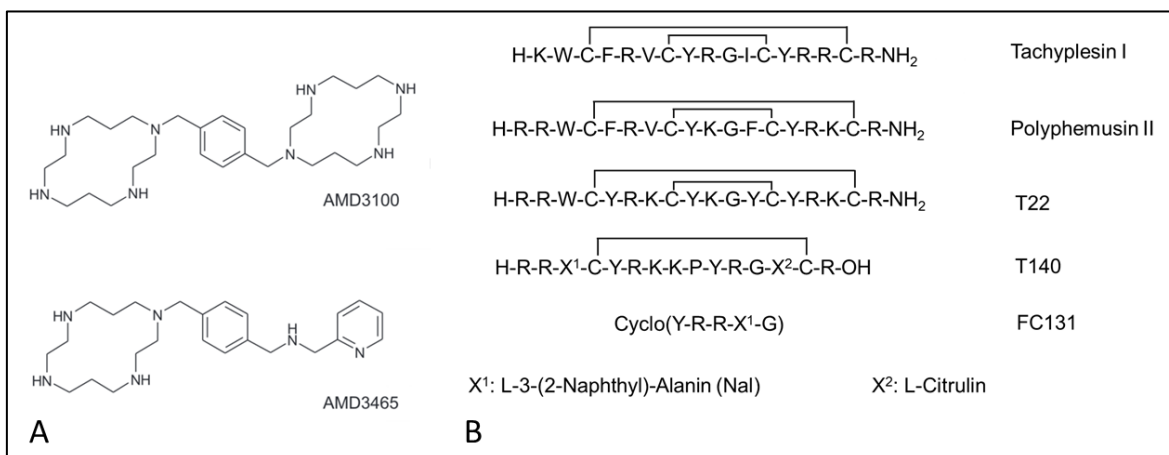
Es ist eine Vielzahl von Antagonisten am CXCR4 bekannt, die strukturell in peptidische und nicht-peptidische Verbindungen unterteilt werden können. Jedoch erlaubt dies keine Rückschlüsse auf die Wirksamkeit der jeweiligen Substanz. Antrieb für die Entwicklung dieser vielen Liganden ist die Tatsache, dass der CXCR4 neben dem CCR5 (CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5, CD195) als Co-Rezeptor beim Eintritt des HI-Virus in T-Zellen fungiert (Oishi und Fujii 2012). So war AMD3100 (Plerixafor) der erste Chemokin-Antagonist, der in klinischen Studien zur HIV-Therapie getestet wurde. Aufgrund fehlender oraler Bioverfügbarkeit wurden die klinischen Studien für diese Indikation jedoch eingestellt (Scozzafava et al. 2002).

Seit 2009 ist AMD3100 in Europa zur Stammzellgewinnung für die Stammzelltransplantation bei Patienten mit Multiplem Myelom oder Non-Hodgkin-Lymphom zugelassen (Cashen et al. 2007). Daneben existieren zahlreiche präklinische und klinische Studien, die einen möglichen günstigen Effekt von AMD3100 bei verschiedenen Krebserkrankungen zum Gegenstand haben (Domanska et al. 2013, D'Alterio et al. 2012, Weitzenfeld und Ben-Baruch 2014). Hiermit soll die Eignung von AMD3100 in der Behandlung von Gehirntumoren, Melanomen, Sarkomen und verschiedenen hämatologischen Neoplasien aufgezeigt werden (Weitzenfeld und Ben-Baruch 2014).

Im Vergleich zum Bizeyklam AMD3100 ist das strukturell ähnliche Monozyklam AMD3465 ein wesentlich potenterer Antagonist am CXCR4 (vgl. Abb. 4) (Rosenkilde et al. 2007).

Die peptidischen Antagonisten leiten sich strukturell vom Tachyplesin und Polyphemusin ab, antimikrobiellen Peptiden, die aus Blutzellen der Pfeilschwanzkrebsarten *Tachyplesus tridentatus* und *Limulus polyphemus* isoliert wurden. Die Strukturen dieser Verbindungen

dienten als Vorlage für die Synthese kleinerer Substanzen, die über eine Reduktion der Disulfidbrücken, wie in der nachfolgenden Abbildung 4 dargestellt, hin zur Synthese zyklischer Pentapeptide wie FC131 führte. Dabei wurden die vier wichtigen AS aus der Substanz T140, Tyrosin (Y), zwei Arginine (R) und L-3-(2-Naphthyl)-Alanin (Nal), mit Glycin (G) als Linker zu einem zyklischen Pentapeptid synthetisiert (Oishi und Fujii 2012). Vorteil dieser Verbindungsklasse ist ihre im Allgemeinen geringe Toxizität und die hohe Stabilität zyklischer Verbindungen gegenüber enzymatischem Abbau (Demmer et al. 2011).

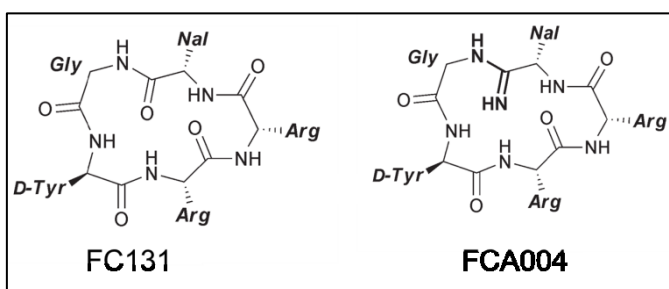


**Abb. 4:** CXCR4-Antagonisten.

**A:** AMD3100 und AMD3465. Strukturelle Darstellung der zwei nicht-peptidischen CXCR4-Antagonisten AMD3100 (Biszyklam) und AMD3465 (Monozyklam) (Scozzafava et al. 2002). **B:** Strukturen peptidischer CXCR4-Antagonisten. Vom Tachyplesin I und Polyphemus II ausgehend wurden zyklische Pentapeptide synthetisiert, indem die Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen schrittweise reduziert wurden. Abbildung verändert nach Nakamura et al., (1988), Oishi und Fujii (2012).

Ausgehend vom FC131 wurde eine Vielzahl analoger Verbindungen, beispielsweise durch den Austausch einzelner AS oder funktioneller Gruppen, synthetisiert und pharmakologisch getestet. Dabei zeigte die

Verbindung FCA004 (vgl. Abb. 5) beispielsweise eine dreißigfach höhere Potenz, verglichen mit FC131 (Oishi und Fujii 2012). Die Potenz eines Antagonisten, die durch die kompetitive Bindung des Inhibitors an das Enzym in Anwesenheit eines Antagonisten bestimmt wird, kann durch den K<sub>i</sub>-



**Abb. 5:** Struktur der beiden Pentapeptide FC131 und FCA004 (Oishi und Fujii 2012).

Wert, einer Bindungskonstanten, ausgedrückt werden. Mit Hilfe des  $IC_{50}$ - Wertes wird die Konzentration eines Inhibitors angegeben, die zur 50%igen Inhibition der Agonistenbindung am Rezeptor führt (Kobayashi et al. 2012).

Einige der Pentapeptide sowie der kleinmolekularen Antagonisten konnten bereits im Mausexperiment erfolgreich für die Bildgebung CXCR4-positiver Tumore eingesetzt werden (Weiss und Jacobson 2013, Gourni et al. 2011).

### **1.8.3) Klinische Einsatzmöglichkeiten von CXCR4-Liganden**

Neben der strahlenbasierten Bildgebung könnte der CXCR4 als immunhistologische Markerstruktur genutzt werden, da er bei einer Vielzahl von Tumoren übermäßig exprimiert wird (Balkwill 2004b). Das setzt jedoch einen Antikörper (AK) mit entsprechender Spezifität voraus. Auch eine Radioligandentherapie (PRRT) ist denkbar und wird heute bereits in der Therapie von NETs, die eine erhöhte Expression von Somatostatinrezeptoren aufweisen, angewendet (Chalkia et al. 2014).

Eine rezeptorgestützte Pharmakotherapie ist ebenfalls eine therapeutische Option, wobei neben CXCR4-positiven Tumoren Entzündungskrankheiten und die HIV-Infektion entsprechende Hauptindikationen darstellen könnten. Bei chronischen Entzündungen könnten durch den Einsatz von CXCR4-Antagonisten zum einen unreife Neutrophile im Knochenmark zurück gehalten und zum anderen die Rekrutierung von Leukozyten hin zu entzündetem Gewebe unterbunden werden (Hummel et al. 2014). Eine Rezeptorblockade in der HIV-Therapie wäre ebenfalls erfolgsversprechend. Mit dem kleinmolekularen AMD11070 wurde ein Ligand gefunden, der trotz seiner Struktur oral verfügbar ist und aufgrund von zellbiologischen Experimenten als potent eingestuft werden kann (Mosi et al. 2012). Für den therapeutischen Einsatz bei malignen Neoplasien werden gegenwärtig verschiedene Antikörper und Antagonisten in klinischen Studien getestet (Galsky et al. 2014, Weitzenfeld und Ben-Baruch 2014). Neben der Verabreichung von CXCR4-Antagonisten ist die Unterbrechung der CXCR4-CXCL12-Achse über CXCL12 ein weiterer möglicher Ansatzpunkt (Zhong et al. 2013, Smith et al. 2014).

## 2) Ziele der Arbeit

Eines der Hauptanliegen der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung des monoklonalen Antikörpers UMB-2 für den umfassenden Rezeptornachweis innerhalb histologischer Präparate aufzuzeigen. Es ist bekannt, dass der Antikörper UMB-2 phosphosensitiv ist (Mueller et al. 2013). Folglich besteht die Möglichkeit, dass bei histologischen Tumorpräparaten nicht alle Rezeptorproteine durch den UMB-2 dargestellt werden können. Um auszuschließen, dass der Rezeptor in der immunhistochemischen Untersuchung zu großen Teilen nicht detektiert werden kann, sollten Gewebeschnitte maligner Neoplasien mit  $\lambda$ -Protein-Phosphatase ( $\lambda$ -PP), die eine Dephosphorylierung des Rezeptors bewirkt, inkubiert und anschließend immunhistochemisch gefärbt werden. Mit dem Vergleich dieser Färbeergebnisse mit jenen von Präparaten, die zuvor nicht mit  $\lambda$ -PP inkubiert worden waren, sollte das Ausmaß der CXCR4-Phosphorylierung in histologischen Tumorpräparaten dargestellt werden.

Durch die immunologische Färbung verschiedener Tumorentitäten und Krebszelllinien sollte aufgezeigt werden, dass der CXCR4 innerhalb verschiedener Tumorentitäten häufig überexprimiert wird, wie es in der Literatur unter anderem für das SCLC beschrieben ist.

Die hohe CXCR4-Expression beim SCLC wird in Literatur mit der ungünstigen Prognose dieser Tumorentität in Verbindung gebracht. Für andere BP-NETs (TC und AC), die eine bessere Prognose aufweisen, wurden dagegen noch keine Studien bezüglich der CXCR4-Expression durchgeführt. Das Auftreten des CXCR4 sollte in der vorliegenden Arbeit daher erstmals bei TC, AC und SCLC gemeinsam, sowohl auf Proteinebene, d.h. immunhistochemisch, als auch auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR (quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) erfasst werden. Mit den zur Verfügung stehenden Patientendaten sollte statistisch überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Rezeptorexpression und dem Überleben hergestellt werden kann. Die immunhistochemisch erzeugte CXCR4-Färbung sollte darüber hinaus mit drei verschiedenen Bewertungssystemen quantifiziert werden, um deren Eignung für die Beurteilung der prognostischen, diagnostischen und therapeutischen Nutzbarkeit der Rezeptorexpression vergleichen zu können.

Durch die Inkubation von Zellen, die den CXCR4-Rezeptor endogen exprimieren bzw. entsprechend mit dem humanen CXCR4 transfiziert worden sind, mit dem endogenen Agonisten CXCL12 und/oder verschiedenen Antagonisten sollte einerseits die Eignung des UMB-2 für rezeptorpharmakologische Untersuchungen, wie z.B. in Bezug auf die Regulation oder das Signaling des CXCR4, verdeutlicht werden. Andererseits sollte das Potential von CXCR4-Antagonisten für eine diagnostische und therapeutische Nutzung aufgezeigt werden.

### 3) Material und Methoden

#### 3.1) Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von den in der Tabelle 3 genannten Herstellern bezogen.

**Tab. 3:** Verwendete Chemikalien.

Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit für die Herstellung von Puffern und Lösungen verwendeten Chemikalien.

| Chemikalie                      | Lieferant                                   |
|---------------------------------|---|
| Acrylamid                       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Ammoniumpersulfat (APS)         | BioGenex, San Ramon, CA, USA                |
| Ampicillin                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Bromphenolblau                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Dinatriumhydrogenphosphat       | MERCK, Darmstadt                            |
| Dithiothreitol                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Ethanol                         | Nordbrand, Nordhausen                       |
| EDTA                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Formalinlösung 4% w/v (10% v/v) | J.T. Baker, Griesheim                       |
| Glycerol                        | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |
| Glycin                          | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Igepal (Nonidet P-40)           | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |
| Isopropanol                     | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Kaliumchlorid                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Kaliumdihydrogenphosphat        | MERCK, Darmstadt                            |
| Lambda-Protein-Phosphatase      | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main |
| Mercaptoethanol                 | MERCK, Darmstadt                            |
| Methanol                        | MERCK, Darmstadt                            |
| Natriumchlorid                  | MERCK, Darmstadt                            |
| Natriumdesoxycholat             | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |
| Natriumdihydrogenphosphat       | MERCK, Darmstadt                            |
| Natriumhydroxid                 | MERCK, Darmstadt                            |
| Paraformaldehyd                 | Riedel-de Haën, Seelze                      |
| Pikrinsäure                     | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |
| Poly-L-Lysin                    | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |
| SDS-Lösung 20%                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| TEMED                           | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Tris-Hydrochlorid               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Tween-20                        | Sigma-Aldrich, Steinheim                    |

Alle Lösungen wurden mit Aqua bidest. (Milli-Q®, Millipore/ MERCK, Darmstadt) hergestellt. Die Mengenangaben im Text beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, jeweils auf einen Liter Lösung.



### 3.2) Untersuchungsmaterial

**Menschliches Material:** Die Paraffinblöcke der BP-NETs wurden vom Labor für Pathologie und Zytologie, Bad Berka, bezogen. Hierbei handelte es sich um typische und atypische Karzinoide (TC, AC) sowie kleinzellige Bronchialkarzinome (SCLC). Die Präparate der anderen vorgestellten Tumorentitäten stammten vom Labor für Pathologie und Zytologie, Bad Berka, und aus den Instituten für Pathologie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und der Charité-Universitäts-Medizin in Berlin.

Alle histologischen Präparate waren in Formalin fixiert und für die weiteren Untersuchungen in Paraffin eingebettet worden.

**Zelllinien:** Es wurden zum einen HEK-293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen), die den CXCR4 in geringem Maße endogen exprimieren, genutzt. Sie wurden zusätzlich mit dem humanen 3xHA-getaggten CXCR4 (Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, USA) stabil transfiziert (CXCR4-HEK293). N-terminal der Rezeptorsequenz wurde dabei die Sequenz für Hämagglutinin (HA)-Epitoptag (MYPYDVPDYA) in das den CXCR4-kodierende Plasmid eingefügt. Mit einem geeigneten Antikörper kann der HA-Tag detektiert werden. Weiterhin wurden verschiedene humane Krebszelllinien genutzt, bei denen eine endogene Expression des CXCR4 festgestellt werden konnte (vgl. Tab. 4).

**Tab. 4:** Übersicht über die verwendeten Zelllinien, Bezugsperson und Art der Zelllinie.

| Zelllinie             | Ursprung  | Wachstum   | Bezugsquelle   |
|-----------------------|---|------------|--|
| <b>HEK-293-Zellen</b> | humane embryonale Nierenzellen  | adhärent   | DSMZ, Braunschweig, Deutschland                            |
| <b>CXCR4-HEK293</b>   | HEK-293-Zellen, die stabil mit dem humanen CXCR4 transfiziert worden sind | adhärent   | Selbst erzeugt   |
| <b>OH-1</b>           | Kleinzelliges Bronchialkarzinom   | Suspension | Prof. Dr. Schumann, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf |
| <b>NCI-h69</b>        | Kleinzelliges Bronchialkarzinom   | Suspension | Prof. Dr. Meike Burger, Universitätsklinikum Freiburg      |
| <b>SW-756</b>         | Squamöses Zervixkarzinom  | adhärent   | Dr. Claudia Backsch, Universitätsklinikum Jena             |

### 3.3) Antikörper

#### Primärantikörper

**UMB-2 (Klon 232-8):** Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den Carboxy-Terminus (Aminosäuren 331-352) des humanen CXCR4. Korrespondierende antigene Sequenz des Peptids, das zur Immunisierung des Kaninchens verwendet wurde: NH<sub>2</sub>-KGKRGGHSSVSTESESSSFHSS-COOH (Epitomics, Burlingame, USA). Eingesetzte

Verdünnung bei Verwendung des Überstandes der Hybridomazellen im Western-Blot 1:5, in der Immunhistochemie: 1:1.

**Anti-pS346/347-CXCR4:** Phosphospezifischer polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Gramsch Laboratories, Schwabhausen). Der Antikörper wurde gegen das Peptid VSTE-SE(pS)(pS)SFHSS generiert. Eingesetzte Verdünnung im Western-Blot: 1:200.

**HA-Antikörper:** Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Gramsch Laboratories, Schwabhausen) gegen den HA-Tag des CXCR4 der HEK-hCXCR4-Zellen. Eingesetzte Verdünnung im Western-Blot: 1:500.

**Anti-Transferrin-Rezeptor-Antikörper (anti-TfR):** Monoklonaler Maus-Antikörper gegen den humanen Transferrin-Rezeptor (Life technologies, Darmstadt). Dieses Rezeptorprotein wird durch die Inkubation der Zellen mit CXCR4-Liganden nicht beeinflusst. Es dient der Kontrolle des gleichmäßigen Probenauftrags bei den Western-Blot-Analysen. Eingesetzte Verdünnung im Western-Blot: 1:2000.

### Sekundärantikörper

**Biotinylierte Antikörper:** Zur immunhistochemischen Darstellung des CXCR4 wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper verwendet (Vectastain® ABC Reagent-Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Eingesetzte Verdünnung: 1:200.

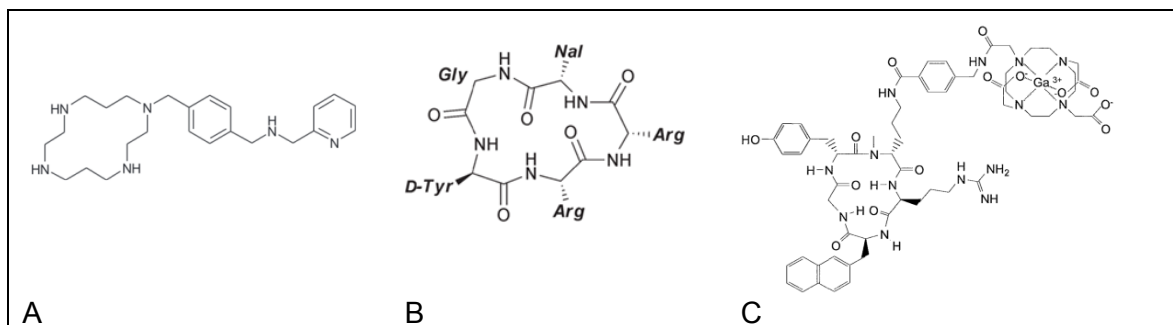
**HRP-gekoppelte Antikörper:** Das Enzym HRP (*engl.*: horseradish peroxidase, *deutsch*: Meerrettich-Peroxidase) katalysiert in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Die dadurch hervorgerufene Chemilumineszenz ermöglicht die Detektion des spezifischen Rezeptorproteins. Es wurden Ziege-anti-Kaninchen- (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) und Schaf-anti-Maus-HRP-gekoppelte Antikörper (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien) verwendet. Eingesetzte Verdünnung im Western-Blot jeweils 1:5000.

**Alexa-488-gekoppelte Antikörper:** Zur immunzytochemischen Detektion des CXCR4 wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 gekoppelter Ziege-anti-Kaninchen-Sekundärantikörper verwendet (Life Technologies, Darmstadt). Eingesetzte Verdünnung: 1:5000.

### 3.4) Antagonisten

Es wurden drei Antagonisten genutzt: AMD3465, FC131 (beide: Tocris, Bristol, Großbritannien) und <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2 (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H.J. Wester, München). Das kleinmolekulare AMD3465 ist ein Monocyclam. FC131 und Ga-CPCR4-2 sind zyklische Pentapeptide (vgl. Abb. 6). <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2 weist eine Spacer-Struktur auf und den Chelator DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure), so dass diese

Verbindung für die diagnostische Bildgebung genutzt werden könnte, indem  $^{68}\text{Ga}$  gebunden wird (Gourni et al. 2011).



**Abb. 6:** Struktur der in der Arbeit verwendeten Antagonisten.

**A:** AMD3465, **B:** FC131, **C:**  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2.

### 3.5) Zellkultur

Alle Zelllinien wurden bei 5%  $\text{CO}_2$ , 95% Luftfeuchte und  $37^\circ\text{C}$  im Brutschrank ( $\text{CO}_2$ -Inkubator, Heracell 150i, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold) kultiviert.

In Abhängigkeit von der Zelllinie wurden entweder DMEM (high Glucose) oder RPMI1640 (beide PAA, Pasching, Österreich, vgl. Tab. 5) mit 10% fetalem Kälberserum (PAA), 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (PAA) und 2 mM L-Glutamin (PAA) komplettiert, im Folgenden mit „(+“ bezeichnet.

**Tab. 5:** Medienzusammensetzung für die genutzten Zelllinien.

| Zelllinie    | Medium      | Zusätzliche Komponenten             |
|--------------|-------------|-------------------------------------|
| HEK-293      | DMEM(+)     |                                     |
| CXCR4-HEK293 | DMEM(+)     | G418 (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) |
| OH-1         | RPMI1640(+) |                                     |
| NCI-h69      | RPMI1640(+) |                                     |
| SW-756       | DMEM(+)     |                                     |

### 3.6) Transfektion von HEK-293-Zellen mit dem humanen CXCR4

#### *Hitzeschocktransformation und Maxipräparation*

Die DNA des humanen 3xHA-getaggt CXCR4 war im Plasmid pcDNA3.1+ (S&T cDNA Resource Center, Rolla, USA) integriert. 250 ng Plasmid-DNA wurden zu 100  $\mu\text{l}$  des in 100 mM Kalziumchlorid und 15 Vol.% Glycerol aufbewahrten, chemisch kompetenten *Escherichia coli*-Stammes DH-5 $\alpha$  gegeben, der zuvor bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert worden war und für die Hitzeschocktransformation auf Eis aufgetaut wurde. Das Gemisch wurde kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte die Erwärmung auf  $42^\circ\text{C}$  für 75 Sekunden. Vor dem Ausplattieren auf LB-Agar (LB-Agar, Invitrogen/ life technologies, Darmstadt), der mit 100  $\mu\text{g}$  Ampicillin pro ml Agar versehen war, wurden die transformierten *E.*

*coli* erneut für zwei Minuten auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden anschließend über Nacht bei 37°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde eine Einzelkolonie gepickt und in 200 ml ampicillinhaltiges (100 µg/ml) LB-Medium (Invitrogen/ life technologies, Darmstadt) überführt. Um den *E. coli* optimale Wachstumsbedingungen zu bieten, wurden diese bei 37°C und 220 rpm (Horizontalschüttler) über Nacht kultiviert, um im Anschluss die Maxipräparation mit Hilfe des Kits „PureLink HiPure Plasmid Filter Purification“ (life technologies, Darmstadt) durchzuführen. Alle Arbeitsschritte wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigte humane 3xHA-getaggte CXCR4-Plasmid-DNA (CXCR4-Plasmid-DNA) wurde in einer Konzentration von 1 µg/µl in Aqua bidest. gelöst.

#### **Stabile Transfektion der HEK-293-Zellen**

Die transiente Transfektion der Zellen mit der aufgereinigten CXCR4-Plasmid-DNA wurde mit Hilfe von Turbofect (Fermentas, Thermo Scientific, St. Leon-Rot), den Angaben des Herstellers folgend, durchgeführt. Zur Selektion stabiler Klone wurden die Zellen 24-48 h danach in der Anwesenheit von 400 µg/ml G418 (PAA, Pasching, Österreich) in DMEM(+) kultiviert.

### **3.7) Inkubation der Zellen mit verschiedenen Liganden**

Um den Einfluss verschiedener Antagonisten auf die CXCL12-induzierte Phosphorylierung des CXCR4 zu untersuchen, wurden die Zellen für die immunzytochemischen Analysen mit verschiedenen Konzentrationen der Antagonisten (FC131, AMD3465, <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2) in Gegenwart von CXCL12 (Peprotech, Hamburg) inkubiert. Dazu wurden die Zellen 15 min mit Antagonist vorinkubiert und anschließend für weitere 15 min zusätzlich mit CXCL12. Außerdem wurden Zellen mit CXCL12 ohne Anwesenheit eines Antagonisten stimuliert. Die Inkubation mit CXCL12 wurde über einen Zeitraum von 15 Minuten mit einer Konzentration von 20 nM durchgeführt, was eine ausreichende und detektierbare Phosphorylierung des CXCR4 bewirkt (Mueller et al. 2013). Um auszuschließen, dass es sich bei den Liganden um Agonisten handelt, wurden die Zellen zusätzlich mit dem Antagonisten allein inkubiert.

Die eingesetzten Liganden wurden für die Experimente in dem entsprechenden zellspezifischen Medium, dem keine Zusätze beigemischt waren, gelöst.

### **3.8) Western-Blot-Analyse**

#### **3.8.1) Rezeptorisolation aus Zellen**

**Adhärenzte Zellen:** Die Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser: 6 cm) kultiviert und bei einer Konfluenz von 80% aufgearbeitet.

**Suspensionszellen:**  $10^6$  Zellen wurden in 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Vor dem Aufbringen von Lösungen und Puffern, mit denen die Zellen vorsichtig aufgeschwemmt wurden, erfolgte jeweils die Zentrifugation der Zellen bei 500 rpm für 2 min. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen.

**Zellaufbereitung:** Nach der Inkubation der Zellen mit CXCL12, dem Antagonisten bzw. dem Antagonisten plus CXCL12, wurden die Zellen kurz mit kaltem PBS (8,18 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,77 g Dinatriumhydrogenphosphat, 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat) gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen, die dazu 10 Minuten mit 1 ml eiskaltem Lyse-Puffer (8,8 g Natriumchlorid, 7,9 g Tris-HCl, 0,9 g EDTA, 10 ml Igepal (Nonidet P-40), 5 g Natriumdesoxycholat, 5 ml SDS, pH 7,4) inklusive Proteaseinhibitoren (Complete mini EDTA-free, Roche, Mannheim) sowie Phosphataseinhibitoren (PhosStop, Roche, Mannheim) auf Eis inkubiert wurden. Durch die anschließende Zentrifugation (30 min, 14000 rpm, 4°C) ist eine Isolation der Proteine aus Zellmembranen und Cytosol möglich, da sich diese nicht als Sediment absetzen.

**Rezeptorisolation aus Zellen mit WGA-Beads:** Der Überstand aus der Zentrifugation wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem Weizenkeimagglutinin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads; Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim) enthalten waren. Diese ermöglichen die Isolation von glykosylierten Proteinen, indem sie hochaffin an diese Bereiche binden.

Die WGA-Beads und der Überstand wurden für 90 Minuten bei 4°C invertiert, wodurch die WGA-Beads an die Glykosylierungsstellen der enthaltenen Proteine binden konnten. Anschließend erfolgte das dreimalige Waschen der WGA-Beads mit 4°C kaltem Lyse-Puffer. Abschließend wurde der Überstand komplett abgenommen und 75 µl 1xSDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2 Vol. % SDS, 20 Vol. % Glycerol, 100 mM Dithiothreitol, 0,005 Vol. % Bromphenolblau) pro Reaktionsgefäß auf die WGA-Beads gegeben. Durch eine Inkubation bei 45°C und 850 rpm für 30 min wurde die Ablösung der Proteine von den WGA-Beads erreicht. Im Anschluss wurde das Gemisch zentrifugiert (5 min, 14000 rpm), im Überstand sind die Rezeptorproteine mit enthalten. Die durch das SDS induzierte Denaturierung der Proteine sowie der Überschuss an negativer Ladung erlaubt eine Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht bei der anschließenden Gelelektrophorese.

### 3.8.2) Darstellung der Rezeptorproteine mittels SDS-Page und Western-Blot

#### **Benötigte Lösungen:**

**Sammelgelpuffer:** 2 g Natriumdodecylsulfat (SDS), 30,28 g Tris, pH-Wert 6,8.

**Trenngelpuffer:** 4 g SDS, 181,72 g Tris, pH-Wert 8,8.

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page):** Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Dazu wurde ein 4%iges grobporiges Sammelgel (1 ml 30% Acrylamid, 1,8 ml Sammelgelpuffer, 9 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED), 24 µl 10% Ammoniumpersulfat (APS), 4,7 ml Aqua bidest.) und ein 10%iges feinporiges Trenngel (5,3 ml 30% Acrylamid, 4 ml Trenngelpuffer, 20 µl TEMED, 80 µl 10% APS, 6,7 ml Aqua bidest.) verwendet. Das Gel wurde in einen mit Elektrophoresepuffer (3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 1g SDS, pH 8,3) befüllten Puffer-Tank gestellt und die Gel-taschen jeweils mit 15 µl der Proben beladen. Das zusätzliche Auftragen von 3 µl Größenmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, St. Leon-Rot) erlaubte einen Rückschluss auf die Größe der aufgetragenen Proteine. Beim Anlegen einer Spannung von 90 V für 20 min wanderten die negativ geladenen Proteine aus den Taschen in das Gel und sammelten sich an der Grenze zum Trenngel. Hierdurch wurde eine Verdichtung der Proteine bewirkt. Anschließend wurde die Spannung auf 130 V erhöht. Mit dem Eintritt der Proteine in das Trenngel erfolgte ihre Auftrennung nach dem Molekulargewicht.

**Western-Blot:** Vorbereitend wurden zwei Whatmanpapiere (Bio-Rad, München) und das Gel für 5 min in Blotpuffer (3,03 g Tris, 11,25 g Glycin, 100 ml 99,9%iges Methanol, pH 8,3) inkubiert. Eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde für 1 min in Methanol aktiviert und in Blotpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte der Aufbau der Blotkammer (Bio-Rad, München) von unten (Anode) nach oben (Kathode): Whatmanpapier – PVDF-Membran – Gel – Whatmanpapier. Bei einer Stromstärke von 200 mA pro Gel erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran innerhalb einer Stunde. Im Anschluss wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in einer Blockierlösung aus 1xTBS-Tween (7,88 g Tris-HCl, 8,7 g Natriumchlorid, 1 ml Tween-20, pH 7,6) mit 5% RSA (Rinderserumalbumin, Sigma-Aldrich, Steinheim) abgesättigt. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper wurde in der selben Lösung durchgeführt (2 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C). Nach anschließendem Waschen in TBS-Tween (3x 10 min) wurde die Membran mit dem in Blockierlösung gelösten HRP-gekoppelten Sekundär-AK inkubiert (2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C). Im Anschluss erfolgte ein erneutes Waschen der Membran mit TBS-Tween (3x 10 min).

**Detektion:** Zur Erzeugung der Chemilumineszenz wurde das kommerziell erhältliche Super-Signal-West-Dura-Detektionskit (Thermo Scientific, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mit dem Fusion-FX7-Chemilumineszenz-Detektions-System (PEQLAB, Erlangen) und die Auswertung mit dem frei verfügbaren Programm Image J (Version 1.48). Zur Kontrolle des gleichmäßigen Probenauftrags wurden die Membranen direkt nach der Detektion in 1xTBS-Tween gewa-

schen und anschließend zur Ablösung der Antikörper bei 50°C für 30 min in Stripping-Puffer (62,5 mM Tris (pH 6,8), 2% SDS, 0,7% Mercaptoethanol) inkubiert. Danach wurden die Membranen gründlich mit Wasser gewaschen, erneut für eine Stunde in die Blockierlösung verbracht und dann mit einem weiteren Primär-Antikörper inkubiert.

### 3.9) Immunzytochemie

In jede Vertiefung einer 24er-Well-Platte (Greiner, Kremsmünster, Österreich) wurde ein Deckgläschen eingebracht, das mit Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) für 30 min beschichtet wurde. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit Aqua bidest..

**Adhärenente Zellen:** In jede Vertiefung der 24er-Well-Platte wurden  $1,5 \times 10^5$  Zellen ausgesät.

**Suspensionszellen:**  $4,5 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Medium wurden in die Vertiefungen der 24-Well-Platte verbracht.

Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. In dieser Zeit erfolgte die Anhaftung der Zellen an die Deckgläschen, die auch bei den Suspensionszellen erreicht werden konnte. Nach der Inkubation der Zellen mit einem Liganden und/oder CXCL12 (vgl. Kapitel 3.7) wurde in jede Vertiefung der Well-Platte für 30 min 500 µl ZAMBONI-Fixierlösung (350 ml Pikrinsäure, 80 g Paraformaldehyd, 63,23 g Natriumhydrogenphosphat, 500 ml Phosphatpuffer (Lösung A: 27,6 g Natriumhdihydrogenphosphat, Lösung B: 35,63 g Dinatriumhydrogenphosphat; 132,8 ml Lösung A + 566,7 ml Lösung B mischen und auf 2000 ml mit Aqua bidest. auffüllen)) gegeben. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliges Waschen der Zellen mit PBS für je 5 min. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden anschließend für je 3 min zunächst 500 µl 50%iges eiskaltes Methanol und dann 500 µl 100%iges eiskaltes Methanol in jede Vertiefung gegeben. Im Anschluss erfolgte erneut ein dreimaliges Waschen mit PBS. Die Inkubation der Zellen mit 500 µl PBS/ 3 Vol. % NGS (normales Ziegenserum, PAA) für eine Stunde führte zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen.

Der Primärantikörper UMB-2 (in PBS/ 1 Vol. % NGS) wurde anschließend über Nacht bei 4°C oder für zwei Stunden bei Raumtemperatur auf die Zellen verbracht. Nachdem die Zellen für 5 min mit PBS gewaschen worden waren, erfolgte die Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa-Fluor-488-Ziege-anti-Kaninchen IgG, life Technologies, Darmstadt, 1:2000 in PBS/ 1 Vol. % NGS) entweder über Nacht bei 4°C oder zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach 3 x 5 min Waschen mit PBS wurden die Zellen mit VectaMount™-Eindeckmedium (Vector Laboratories, Burlingame, USA) eingedeckt. Nachdem das Eindeckmedium getrocknet war, wurden die Präparate am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Carl Zeiss, Jena) ausgewertet.

### 3.10) Immunhistochemie

**Gewebeproben:** Die in Formalin fixierten Gewebeproben wurden, eingebettet in Paraffin, von den genannten Laboren und Kliniken (vgl. Kap. 3.2) zur Verfügung gestellt.

**Zytoblöcke:** Zur Herstellung der Zytoblöcke wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80-100% kultiviert. Nach der optionalen Inkubation der Zellen mit einem Liganden wurden die Zellen einmalig mit PBS gespült und in 10%ige gepufferte Formalin-Lösung überführt. Nach zwei Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (10000 rpm, 10 min) und das Formalin vollständig entfernt. Anschließend erfolgte die Vereinzelung der Zellen in 1 ml humanem Plasma (Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Jena, Jena). Durch die anschließende Zugabe von 100 µl Fibrinogen (Stago, Düsseldorf) und sofortigem Vortexen wurde eine Koagulation des Gemisches bewirkt. Die auf diese Weise eingebetteten Zellen wurden in Biopsiekassetten eingebracht und bis zur Einbettung in Paraffin in 10%igem gepuffertem Formalin gelagert.

#### 3.10.1) Einbettung der Präparate in Paraffin und Entparaffinieren

**Einbettung der Präparate:** Um Gewebe- oder Zellproben in Paraffin gießen zu können, ist es nötig, diese zu entwässern. Mit Hilfe einer Histokinette (Jung-Histokinette, Leica, Solms) wurden die Präparate zunächst in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50% - 60 min; 70%, 80%, 96%, 100% jeweils 100 min) inkubiert. Über eine anschließende Einbringung in Isopropanol (2x 180 min) erfolgte im Anschluss die Überführung in flüssiges, 1:2 mit Isopropanol versetztes Paraffin (60° C) für 60 min. Um das Isopropanol auszuwaschen, wurden die Proben zweimal in frisches Paraffin verbracht, um sie abschließend in Paraffinblöcke zu gießen. Nach Aushärtung des Paraffins ließen sich aus den auf diese Weise hergestellten Gewebe- bzw. Zytoblöcken mit Hilfe eines Mikrotoms (Rotationsmikrotom HM 335 E, Microm, Walldorf) Schnitte mit einer Dicke von 4 µm herstellen, die auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgebracht wurden.

**Entparaffinieren:** Für die Durchführung von Färbungen wurden die in Paraffin eingebetteten Schnitte dreimal 20 min in Xylol verbracht, was eine Lösung des Paraffins bewirkt. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation in 100% Ethanol (3 x 20 min), um das Xylol zu entfernen. Das Blockieren endogener Peroxidasen wurde erreicht, indem die Präparate für 45 min in Methanol/ 0,3 Vol. % Wasserstoffperoxid inkubiert wurden. Dadurch wird eine unspezifische Reaktion mit dem Chromogen Aminoethylcarbazol (AEC) verhindert, indem endogene Peroxidasen blockiert werden. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 95%, 80%, 70%, 2 x Aqua bidest. - jeweils 2 min) inkubiert. Die Antigendemaskierung wurde durch Erhitzen der Proben bewirkt, was zur Aufhebung der Proteinvernetzungen führt. Dadurch wird eine bessere Erkennung des



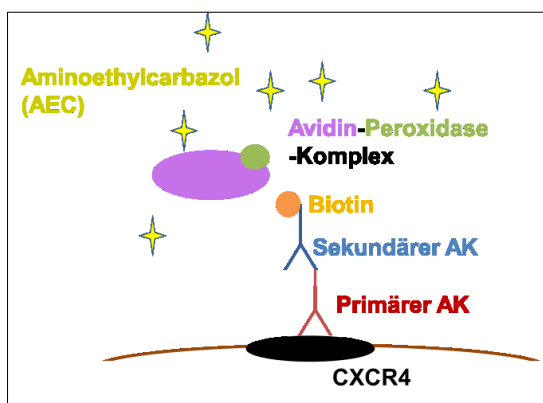
spezifischen Epitops durch den Antikörper und entsprechend eine Verstärkung der Signalintensität bewirkt. Praktisch wurde dieser Effekt durch das Kochen der Proben in Citratpuffer (Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure auf 1 l Aqua bidest.; Stammlösung B: 29,41 g Natriumcitrat auf 1 l Aqua bidest.; Gebrauchslösung: 18 ml A und 82 ml B, pH 6,0) erreicht. Die Proben wurden hierzu in mikrowelleneignete Plastikkuvetten umsortiert und nachfolgende Schritte durchgeführt:

- 8 min kochen, 4 min abkühlen
- 4 min kochen, 4 min abkühlen
- 4 min kochen, 20 min abkühlen
- 5 min in Aqua bidest. überführen

Im Anschluss erfolgte das Waschen der Schnitte in PBS/ 1% RSA für 5 min. Hierdurch wird eine Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes erreicht, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend erfolgte das Einspannen der Proben in das Sequenza-Färbesystem (Thermo Scientific, Waltham, USA). Bei diesem System entsteht nach Einspannen des Präparats ein kapillärer Spalt, über welchen die weiteren Lösungen zugegeben werden können. Im Anschluss daran wurden die Präparate mit 1500 µl PBS/ 1% RSA gespült, um den korrekten Sitz der Präparate im System zu überprüfen.

### 3.10.2) Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Zur immunhistochemischen Darstellung des CXCR4 wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode verwendet. Das Funktionsprinzip dieser doppelt indirekten Nachweisteknik beruht auf der Umsetzung von  $H_2O_2$  durch die Peroxidase, die an Avidin gebunden ist, welches wiederum an das Biotin des Sekundärantikörpers bindet. Die Peroxidase katalysiert die Freisetzung von Sauerstoff aus  $H_2O_2$ , der mit dem Chromogen AEC reagiert und in der Folge eine Rotbraunfärbung der Zielstrukturen bewirkt (vgl. Abb. 7).



**Abb. 7:** Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Die Präparate wurden zunächst mit dem Primärantikörper UMB-2 (aufgereinigt: 1:100 oder Überstand der Hybridoma-Zellen 1:1 in PBS/ 1% RSA, 300 µl) bei 4°C über Nacht inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal mit 1500 µl PBS/ 1% RSA gespült, um nicht gebundenen oder unspezifisch gebundenen Antikörper zu entfernen. Der biotinylierte Sekundärantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-IgG) wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:200, je 150 µl, für 30 min

auf die Präparate gegeben. Die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Verdünnung 1:25, 150 µl) erfolgte nach erneutem Spülen mit PBS/ 1% RSA (1500 µl) für 30 min. Danach wurde die Färbelösung (10 ml Aqua bidest., 2,5 ml 5xH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 5x Acetat-Puffer, 5 Tropfen AEC) für 2 x 15 min, je 150 µl, auf die Präparate gegeben. Zum Beenden der Reaktion wurden die Präparate mit 1500 µl Aqua bidest. gespült. Abschließend erfolgte die Gegenfärbung der Zellkerne mit Hämatoxylin für 5 min. Im Anschluss wurde dreimal mit Aqua bidest. gespült. Das fünfmalige Eintauchen in Ammoniaklösung bewirkte eine Blaufärbung der Zellkerne. Die Präparate wurden im Anschluss wiederholt mit Aqua bidest. gespült und mit Mowiol-488-Eindeckmedium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) eingedeckt.

### 3.11) Charakterisierung des UMB-2

#### 3.11.1) Dot-Blot

Bei den zur Überprüfung der Spezifität des UMB-2 durchgeführten Dot-Blots wurden die jeweiligen CXCR4-Peptide in einer Verdünnungsreihe (0,125 – 2 µg) auf eine PVDF-Membran aufgebracht. Zur Bindung der Peptide an die Membran wurde diese 30 min in einem Minifold-I-Vakuumfiltrationssystem (Schleicher und Schuell, München) inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen (2 Stunden, Western-Blot-Blockierlösung). Die Immundetektion erfolgte wie beim Western-Blot (vgl. Kap. 3.8).

#### 3.11.2) Lambda-Protein-Phosphatase

Mit Hilfe der Lambda-Protein-Phosphatase (λ-PP, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) kann die Dephosphorylierung des Rezeptors vor einem immunologischen Nachweis bewirkt werden. Um zu zeigen, in welchem Ausmaß bei immunhistochemischen Färbungen der gesamte Anteil an CXCR4-Rezeptoren sichtbar wird, wurde die λ-PP bei der Immunhistochemie genutzt. Zuvor wurde ihre Dephosphorylierungsfähigkeit in der Western-Blot-Analyse geprüft.

**Immunhistochemie:** Aus Zytoblöcken hergestellte Paraffinschnitte und ausgewählte Schnitte von Tumorpräparaten wurden für 3 h bei Raumtemperatur mit λ-PP (800 U/ml) inkubiert und anschließend 3 x mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die immunhistochemische Färbung, wie in Kapitel 3.10 beschrieben.

**Western-Blot-Analyse:** Nach der Isolation der Rezeptorproteine mit Hilfe von Weizenkeimagglutinin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads) wurden die betreffenden Proben für drei Stunden bei 37°C mit λ-PP (800 U/ml) inkubiert und anschließend dem Protokoll folgend weiter prozessiert (vgl. Kap. 3.8).

### 3.11.3) Peptidneutralisation

Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Peptidneutralisation durchgeführt. Das Peptid  $\text{HN}_2\text{-KGKRGHSSVSTESESSSFHSS-COOH}$  (10 µg/ml), das zur Immunisierung des Kaninchens verwendet worden war, und der aufgereinigte Antikörper UMB-2 (1:100) in PBS/ 5% RSA wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch anstelle des alleinigen Antikörpers dem immunhistochemischen Protokoll folgend (vgl. Kap. 3.10) auf die Proben gegeben.

### 3.12) Bewertung der Färbeintensität der immunhistochemischen Präparate

In der vorliegenden Arbeit wurden drei Bewertungssysteme genutzt:

**Immunreaktivitäts-Score nach Remmele und Stegner:** Der IRS errechnet sich aus dem Produkt des Wertes, der den Prozentsatz aller gefärbten Zellen wiedergibt, und dem, der die Intensität der Färbung angibt; dementsprechend können Werte zwischen 0 und 12 erreicht werden (vgl. Tab. 6).

**Tab. 6:** Gruppierung und Interpretation des Immunreaktivitäts-Scores nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987).

| Intensität der Färbung | x | Prozentsatz gefärbter Zellen | = IRS (0-12) | Interpretation der Rezeptorexpression |
|------------------------|---|------------------------------|--------------|---------------------------------------|
| 0 (ungefärbt)          |   | 0 (keine Zellen)             | 0 – 1        | negativ (0)                           |
| 1 (schwach)            |   | 1 (<10%)                     | 2 – 3        | schwach positiv (1)                   |
| 2 (mäßig stark)        |   | 2 (10-50%)                   | 4 – 8        | mäßig stark positiv (2)               |
| 3 (stark)              |   | 3 (51-80%)                   | 9 – 12       | stark positiv (3)                     |
|                        |   | 4 (>80%)                     |              |                                       |

**EGFR-Score:** Dieser Score berechnet sich wie folgt:  $\text{EGFR} = (1 \times (\% \text{ Zellen } 1+) + 2 \times (\% \text{ Zellen } 2+) + 3 \times (\% \text{ Zellen } 3+))$ . **1+, 2+, 3+** geben die Intensität der Membranfärbung an. Dementsprechend kann die Intensität der Färbung einen Wert zwischen Null und 300 erreichen (vgl. Tab. 7) (Pirker et al. 2012).

**Tab. 7:** Gruppierung und Interpretation des EGFR-Scores.

| Gruppiertes ermittelter EGFR-Score-Wert | Interpretation der Rezeptorexpression |
|---|---------------------------------------|
| 0 bis 50                                | negativ (0)                           |
| 51 bis 100                              | schwach positiv (1)                   |
| 101 bis 200                             | mäßig stark positiv (2)               |
| 200 bis 300                             | stark positiv (3)                     |

### **Her2neu-Score**

Der Her2neu-Score kann eine Ausprägung zwischen 0 und 3+ erreichen, wobei für eine positive Bewertung des Präparats mindestens 10% der Zellen eine immunhistochemische Färbereaktion aufweisen müssen. Der vergebene Zahlenwert dient der Bewertung der Stärke der Färbereaktion (vgl. Tab. 8) (van de Wouw et al. 2004).

**Tab. 8:** Ermittlung und Interpretation des Her2neu-Scores.

| Score | Reaktionsmuster                                     | Interpretation der Rezeptorexpression |
|-------|---|---------------------------------------|
| 0     | keine Färbereaktion oder < 10% positive Tumorzellen | negativ                               |
| 1+    | > 10% der Tumorzellen mit schwacher Färbereaktion   | negativ                               |
| 2+    | > 10% der Tumorzellen mit mäßiger Färbereaktion     | schwach positiv                       |
| 3+    | > 10% der Tumorzellen mit starker Färbereaktion     | stark positiv                         |

### **3.13) PCR-Analyse der Paraffinschnitte**

Die Ermittlung der in den Paraffinschnitten enthaltenen Mengen an CXCR4-mRNA wurde von der Firma STRATIFYER Molecular Pathology GmbH (Köln, Deutschland) und dort von Dr. Wirtz durchgeführt. Hierzu wurde die RNA aus den randomisiert ausgewählten Gewebeschnitten isoliert und eine quantitative reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) durchgeführt.

Die mRNA-Analyse wurde mit 4 µm dicken Paraffin-Schnitten vorgenommen. Im Vorfeld wurde der prozentuale Anteil an Tumorgewebe innerhalb eines jeden Paraffinschnitts von einem Pathologen erhoben. Bei der Mehrzahl der Schnitte, die weniger als 50% Tumor enthielten, wurde dieser Anteil für die Messungen isoliert.

Obwohl die Gewebeproben in Formalin fixiert und Paraffin eingebettet vorlagen, war es möglich, mit Hilfe diverser Kits (XTRAKT RNA kits, STRATIFYER) und eines Pipettierautomaten (XTRACT XL, STRATIFYER), die Nukleinsäuren zu extrahieren und einen DNase-Verdau durchzuführen, um eine Verunreinigung der Proben durch DNA zu vermeiden. Die eigentliche Isolation der RNA wurde mit Hilfe germaniumbeschichteter magnetischer Kügelchen durchgeführt. Die DNA-freien RNA-Proben wurden im Anschluss in 100 µl Elutionspuffer aufgenommen und bei -80°C gelagert.

Um die Qualität und Quantität der Proben zu bestimmen, wurde die Expression von Calmodulin 2 (CALM2), das als Referenzgen gewählt wurde, gemessen. Als Positivkontrolle wurde eine kommerziell verfügbare humane Referenz-RNA genutzt (Stratagene qPCR Human Reference Total RNA, Agilent Technologies, Waldbronn). Die qRT-PCR-gestützte Bestimmung der Expression sowohl des Zielgens als auch des Referenzgens CALM2 erfolgte dreimalig mit Hilfe des Kits SuperScript III PLATINUM One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, Karlsruhe) in einem Stratagene Mx3005p (Agilent Technologies, Böblingen). Um Verunreinigungen auszuschließen, wurden jeweils 2 DNA-freie Ansätze

mitgeführt. Es wurden 40 PCR-Zyklen durchgeführt, wobei ein Schwellenwert (C-T: Cycle Threshold) von 200 für das Zielgen bestimmt wurde. Die C-T-Werte wurden normalisiert, indem der C-T-Wert von CALM2 vom ermittelten C-T-Wert der CXCR4-mRNA abgezogen wurde ( $\Delta$ C-T). Proben, deren C-T-Werte von CALM2 unter 32 lagen, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Die auf diese Weise ermittelten  $\Delta$ C-T-Werte wurden für die statistische Analyse in Quartile geteilt (vgl. Tab.9).

**Tab. 9:** Einteilung der  $\Delta$ C-T-Werte in Quartile und Interpretation.

| $\Delta$ C-T-Wert | Quartil | Interpretation des mRNA-Levels |
|-------------------|---------|--------------------------------|
| $\leq 29,49$      | 0       | negativ                        |
| 29,50-32,99       | 1       | schwach                        |
| 33,00-36,49       | 2       | moderat                        |
| $\geq 36,5$       | 3       | stark                          |

### 3.14) Statistische Auswertung

Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms IBM SPSS statistics 22. Folgende Tests wurden angewendet:

**Kolmogorov-Smirnov-Test:** Test auf Normalverteilung der Daten. Wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  beträgt, liegt eine Abweichung von der Normalverteilung vor.

**Kruskall-Wallis-Test:** Erlaubt den Vergleich mehrerer unabhängiger Gruppen untereinander, wobei die Daten nicht normalverteilt vorliegen müssen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  spricht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

**Mann-Whitney U-Test:** Im Unterschied zum Kruskal-Wallis-Test werden 2 unabhängige Gruppen direkt miteinander verglichen. Eine Normalverteilung der Daten muss nicht vorliegen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  spricht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

**Log-Rank-Test:** Dieser nichtparametrische Test dient dem Vergleich von Überlebensraten in zwei oder mehr voneinander unabhängigen Stichproben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  spricht für einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

**Spearman-Rangkorrelationskoeffizient  $r$ :** Dieser Korrelationskoeffizient wird bei ordinal skalierten oder nicht normalverteilten Variablen angewendet und misst den Zusammenhang zwischen den Variablen, indem deren Werten Rangplätze zugeordnet werden. Die berechneten Werte sind je nach Richtung des Zusammenhangs positiv oder negativ, wobei eins einer perfekten Korrelation entspricht und null keiner (vgl. Tab. 10).

**Tab. 10:** Interpretation des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten  $r$ .

| Ausprägung des Koeffizienten | Interpretation                          |
|------------------------------|---|
| $r = 0$                      | keine Korrelation                       |
| $0 < r < 0,5$                | schwache Korrelation                    |
| $0,5 < r < 0,8$              | mittelstarke Korrelation                |
| $0,8 < r < 1$                | starke Korrelation                      |
| $r = 1, -1$                  | perfekte positive/ negative Korrelation |

**Überlebenszeitraum:**

Der gesamte Erhebungszeitraum der vorliegenden Studie erstreckte sich über etwa 15 Jahre, der späteste Kontakt zu einem Patienten fand Ende 2013 statt.

Als Überlebenszeit wird der Zeitraum zwischen Erstdiagnose und letztem Kontakt zum Patienten bzw. Tod des Patienten verstanden. Der Patientenkontakt wird in den Kaplan-Meier-Kurven durch die Angabe „zensiert“ wiedergegeben. Die Variable „Gesamt-Überlebenszeit“ erfasst für jeden Patienten den Zeitraum zwischen Datum der Erstdiagnose und letztem Kontakt bzw. Tod des Patienten. Der Zeitraum, in dem Kontakt zum Patienten bestand, unterscheidet sich zwischen den Probanden mitunter stark, was zu Verzerrungen hinsichtlich der Lagemaße des Überlebenszeitraums führen kann. D.h. beispielsweise, der letzte Kontakt zu einem Patienten fand zwei Jahre nach Erstdiagnose statt; diesem Patienten würde dementsprechend ein Überlebenszeitraum von 24 Monaten zugeschrieben. Folglich kann ein möglicherweise wesentlich längeres Überleben des Patienten nicht erfasst werden, was jedoch einen starken Einfluss auf die Lagemaße der Gruppe hätte (in der vorliegenden Arbeit das Überleben in Abhängigkeit von der Tumorentität). Um dahingehend mögliche Verzerrungen zu umgehen, wurden zusätzlich die Variablen „3-Jahres-Überleben“ und „5-Jahres-Überleben“ generiert. Hier werden nur Daten von Patienten berücksichtigt, zu denen nach diesem Zeitraum (3 oder 5 Jahre) ein Kontakt bestand bzw. die nach *oder* im angegebenen Zeitraum verstorben.

Für die Generierung der Kaplan-Meier-Überlebenskurven ist es irrelevant, welche Variable der Überlebenszeit genutzt wird. Dementsprechend wurden alle Kaplan-Meier-Überlebenskurven mit der Variable „Gesamt-Überlebenszeit“ generiert.

**Bildung von Cut-off-Werten:**

SPSS ermöglicht die Errechnung von Gruppen, basierend auf einer Variablen, deren Ausprägung die Grenze für die Bildung zweier, signifikant voneinander unterschiedlicher Klassen bzw. Gruppen bedingt. Diese Grenze bzw. der spezifische Wert der Variablen, auf deren Basis die Klassierung durchgeführt wurde, kann als Cut-off- bzw. Grenzwert für die Bildung zweier Gruppen interpretiert werden.

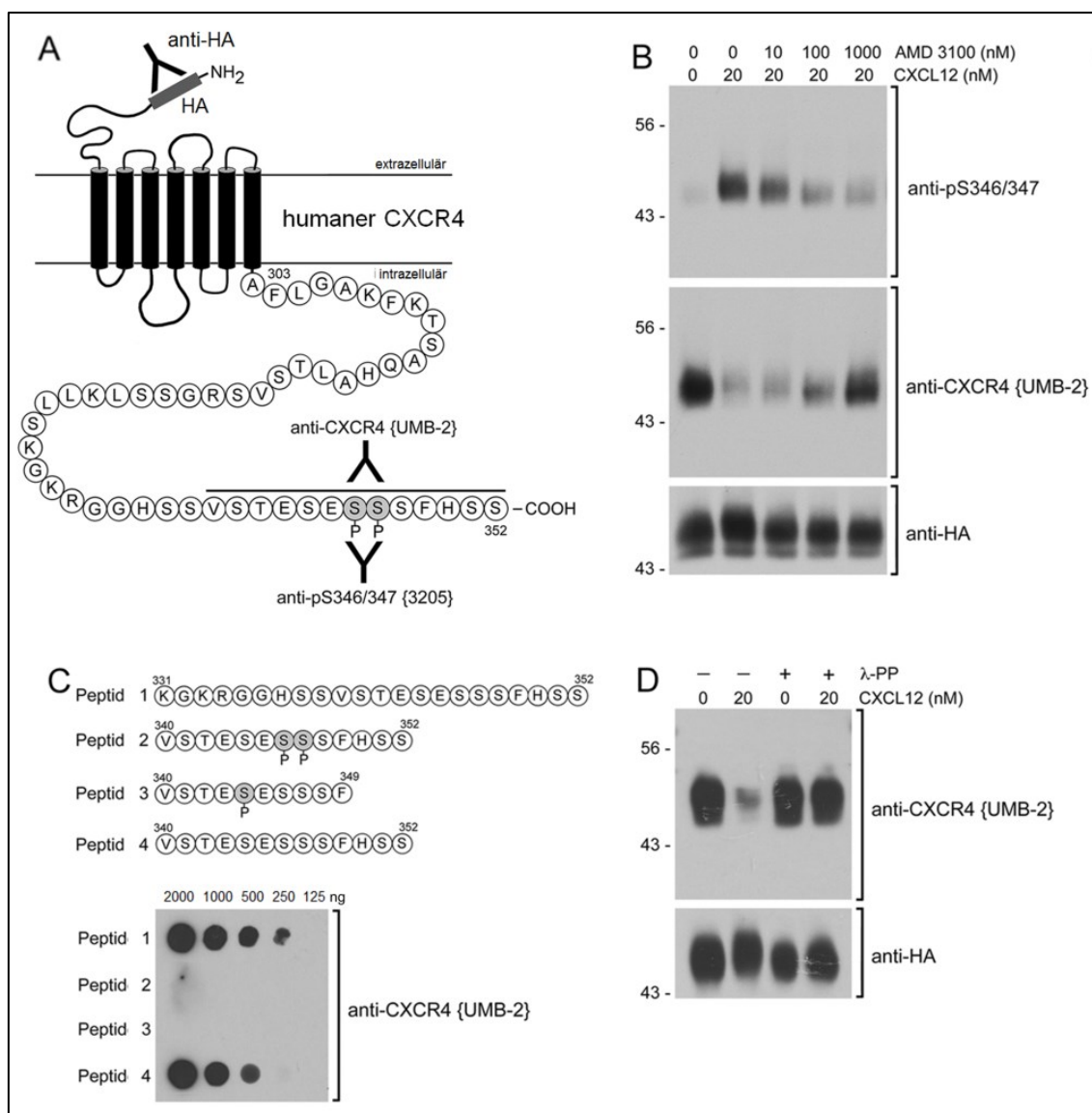
In der vorliegenden Arbeit wurden die Cut-off-Werte für die verschiedenen Auswertungsscores bzw. das mRNA-Level mit der Variable Gesamt-Überlebenszeit ermittelt.

## 4) Ergebnisse

### 4.1) Darstellung des CXCR4 mit dem phosphosensitiven UMB-2

Für die immunologische Detektion des CXCR4 wurden verschiedene Antikörper genutzt: der phosphosensitive UMB-2, der phosphospezifische anti-pS346/347-AK und der HA-AK. Die Bindung dieser AK (außer HA-AK) an den Rezeptor ist von dessen Phosphorylierung und folglich auch Aktivierung abhängig. Der UMB-2 erkennt den unphosphorylierten Rezeptor, eine Phosphorylierung der Serine in Position 346 und 347 verhindert seine Bindung. Der anti-pS346/347-AK erkennt hingegen den CXCR4 nur, wenn eine Phosphorylierung der oben genannten Serine vorliegt. Der HA-AK bindet an den HA-Tag, der molekularbiologisch vor dem N-Terminus des CXCR4 eingebracht wurde. Er erlaubt die phosphorylierungsunabhängige Darstellung der Rezeptorproteine der CXCR4-HEK293-Zellen (vgl. Abb. 8 A).

Um die eben beschriebene phosphorylierungsabhängige Bindung der AK an den Rezeptor aufzuzeigen, wurden CXCR4-HEK-293-Zellen entweder mit 20 nM CXCL12 allein oder zusätzlich mit aufsteigenden Konzentrationen des Antagonisten AMD3100 inkubiert. Abbildung 8 B verdeutlicht mit Hilfe der Western-Blot-Analyse, dass der pS346/347-AK nicht an den unstimulierten (und folglich im Bereich der Serine 346 und 347 unphosphorylierten) CXCR4 bindet. Beim UMB-2 ist erwartungsgemäß das Gegenteil der Fall; es lässt sich ein intensives Signal bei den unstimulierten Zellen detektieren. Eine Inkubation der CXCR4-HEK293-Zellen mit 20 nM CXCL12 für 15 Minuten bedingt nach der Rezeptoraktivierung eine GRK-vermittelte Phosphorylierung. Diese lässt sich mit dem pS346/347-AK als eine intensive Bande detektieren; der AK bindet im Bereich der phosphorylierten Serine. Beim UMB-2 ist das nicht der Fall; er kann aufgrund der Phosphorylierung nicht mehr binden und es lässt sich nur ein schwaches Signal bei der Western-Blot-Analyse detektieren. Eine zusätzliche Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen an AMD3100 bewirkt bei der Detektion des Rezeptors mit dem pS346/347-AK eine Signalabnahme, bei der mit dem UMB-2 dagegen eine Signalzunahme. Das zeigt, dass das CXCL12 mit steigender AMD3100-Konzentration zunehmend an der Rezeptorbindung gehindert wird. Mit Hilfe des HA-AKs, der phosphorylierungsunabhängig bindet, kann gezeigt werden, dass sich die Proben hinsichtlich der aufgetragenen Rezeptormenge nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Dementsprechend eignen sich die vorgestellten AK zur spezifischen Darstellung des CXCR4 und dessen Phosphorylierung im Rahmen der Western-Blot-Analyse.



**Abb. 8:** Charakterisierung der CXCR4-Antikörper.

Die Western-Blot- und Dot-Blot-Experimente wurden mit CXCR4-HEK293-Zellen durchgeführt.

**A:** Schema des humanen CXCR4 mit den Epitopen der verwendeten Antikörper innerhalb des C-Terminus. **B:** Western-Blot-Analyse. CXCR4-HEK293-Zellen wurden entweder nicht, nur mit 20 nM CXCL12 oder zusätzlich mit einer aufsteigenden Konzentration an AMD3100 inkubiert.

Die Detektion des CXCR4 erfolgte mit dem phosphospezifischen anti-pS346/347-AK, dem phosphosensitiven UMB-2 oder dem anti-HA-AK. Gezeigt ist stets die gleiche Membran, von der die AK jeweils durch Stripping-Puffer wieder entfernt worden sind.

**C:** Dot-Blot-Analyse. Die AS-Sequenz der verwendeten Peptide (1-4) ist dargestellt, die phosphorylierten Serine sind grau unterlegt. Der UMB-2 wurde mit Hilfe des Peptides 1 erzeugt, Peptid 4 stellt eine verkürzte Version dar. Für den Dot-Blot wurden je absteigende Mengen (2000-125 µg) der Peptide auf eine PVDF-Membran aufgetragen und mit dem UMB-2 detektiert.

**D:** Western-Blot-Analyse. CXCR4-HEK293-Zellen wurden entweder nicht oder mit 20 nM CXCL12 für 15 Minuten inkubiert. Ein Aliquot der Proben wurde jeweils mit λ-PP behandelt, was eine Dephosphorylierung der Rezeptorproteine bewirkt. Größe des CXCR4: ~ 47 kDa.

Die Dot-Blot-Analyse, mit der die Bindungseigenschaften des UMB-2 an verschiedene Peptide dargestellt werden können, verdeutlicht die Phosphosensitivität des UMB-2. Nur bei Peptid 1 (AS 331-352 des CXCR4) und 4 (AS 340-352 des CXCR4) kann ein Signal detektiert werden, bei den phosphorylierten Peptiden 2 (AS 340-352, pS346/347



des CXCR4) und 3 (AS 340-348, pS344) hingegen nicht (vgl. Abb. 8 C). Außerdem kann aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass das Epitop des UMB-2 die AS 344-347 einschließt.

Die zusätzliche Inkubation der Proben, nachdem sie gegebenenfalls mit CXCL12 inkubiert worden waren, mit  $\lambda$ -PP verdeutlicht, dass die CXCL12-induzierte Rezeptorphosphorylierung durch die  $\lambda$ -PP aufgehoben werden kann (vgl. Abb. 8 D). Das mit Hilfe des UMB-2 erzeugte Western-Blot-Signal unterscheidet sich bei den mit  $\lambda$ -PP behandelten Proben nicht von der Kontrollprobe, wohingegen das Signal der nicht mit  $\lambda$ -PP behandelten Proben schwach ist und die Phosphorylierung des Rezeptors verdeutlicht.

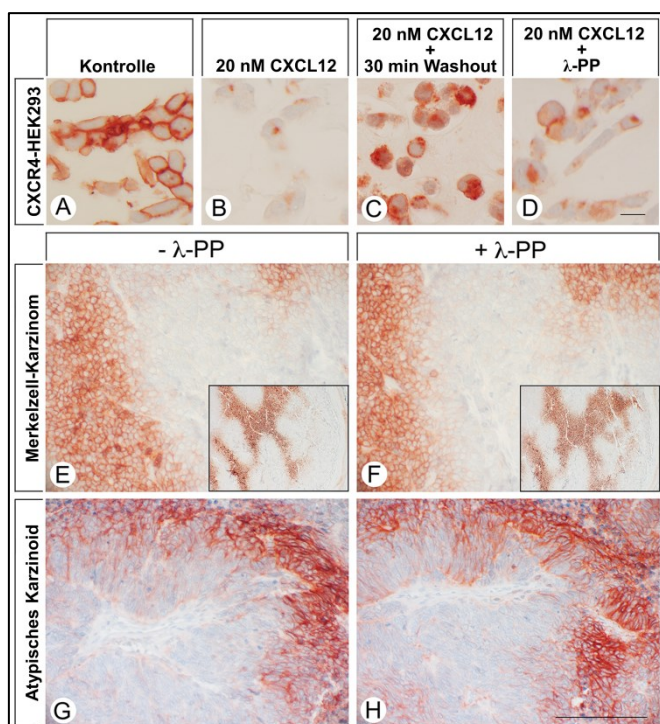
Diese Ergebnisse zeigen, dass sich der unphosphorylierte CXCR4 mit Hilfe des UMB-2-AKs sehr gut mit Hilfe der Western-Blot-Analyse darstellen lässt; außerdem kann die Phosphorylierung des Rezeptors mit Hilfe der  $\lambda$ -PP aufgehoben werden.

Um zu überprüfen, ob mit Hilfe des phosphosensitiven UMB-2 in histologischen Präparaten der gesamte Rezeptoranteil dargestellt werden kann oder aufgrund einer Phosphorylierung nur ein Teil der Rezeptoren erfasst wird, wurden CXCR4-HEK293-Zellen und histologische Präparate immunhistochemisch gefärbt. Jeweils eines der zwei in Paraffin eingebetteten Präparate wurde vor der Färbung mit  $\lambda$ -PP inkubiert. Dadurch können die Färbeargebnisse miteinander verglichen werden.

Für die genutzten Zytoblöcke wurden die Zellen entweder nicht behandelt (Kontrolle), 15 min mit 20 nM CXCL12 inkubiert oder nach der CXCL12-Inkubation 30 min in Medium gelagert (Washout), wodurch eine Dephosphorylierung des CXCR4 bewirkt werden sollte. Eine der mit CXCL12 inkubierten Proben wurde vor der Färbung mit  $\lambda$ -PP behandelt (vgl. Abb. 9).

Mit Hilfe der verschiedenen prozessierten Zytoblöcke konnte zum einen gezeigt werden, dass das CXCL12 zur Phosphorylierung des CXCR4 und dementsprechend zu einer schwächeren Bindung des UMB-2 im Vergleich zu den unbehandelten Zellen führt (vgl. Abb. 9 A und B) und zum anderen, dass sich der CXCR4 nach einem Washout oder nach der Behandlung mit CXCL12, gefolgt von einer Dephosphorylierung durch die  $\lambda$ -PP an der Membran detektieren lässt.

Beim Vergleich serieller histologischer Tumorpräparate, die vor der Immunfärbung entweder mit  $\lambda$ -PP inkubiert wurden oder nicht, wird deutlich, dass sie sich hinsichtlich der Intensität, mit der der CXCR4 detektiert wurde, nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Dementsprechend kann geschlussfolgert werden, dass der CXCR4 in routinemäßig hergestellten histologischen Präparaten, die in der Regel nach der Entnahme nicht sofort in Formalin verbracht werden, größtenteils unphosphoryliert vorliegt und sich mit Hilfe des UMB-2 gut darstellen lässt (vgl. Abb. 9 E-H).



**Abb. 9:** Zytoblocke und Tumorpräparate.

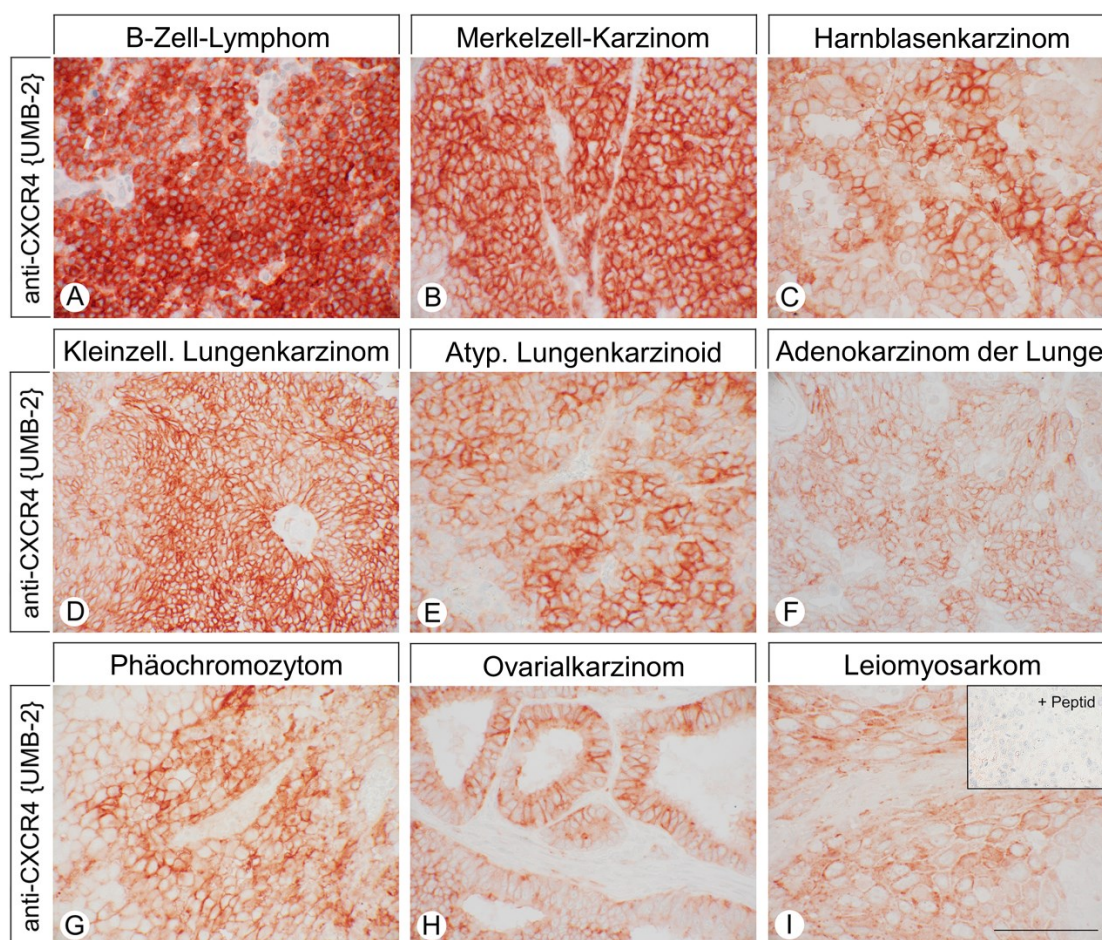
Immunohistochemische Detektion des CXCR4 mit dem UMB-2.

**A-D:** CXCR4-HEK293-Zellen, die nach unterschiedlicher Behandlung zum Zytoblock prozessiert wurden. Die Kontrollprobe wurde nicht behandelt. Ein Paraffinschnitt mit CXCL12-inkubierten Zellen (20 nM, 15 min) wurde vor der immunhistochemischen Färbung mit  $\lambda$ -PP behandelt. Zur Herstellung eines weiteren Zytoblocks wurden die Zellen 30 Minuten mit Medium inkubiert (Washout). Vergrößerung:  $10\times 63$ . Größenbalken: 25  $\mu\text{m}$ . **E-H:** Von je zwei seriellen Präparaten eines Merkelzell-Karzinoms (E-F) und eines AC (G-H) wurde eines vor dem immunhistochemischen Rezeptornachweis zusätzlich mit  $\lambda$ -PP inkubiert. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Vergrößerung  $10\times 40$ , gerahmte Bild-in-Bild-Abbildung (E-F):  $10\times 10$ . Größenbalken: 100  $\mu\text{m}$ .

## 4.2) CXCR4-Expression in verschiedenen Tumoren

Bei verschiedenen humanen Tumorpräparaten konnte der CXCR4 immunhistochemisch detektiert werden (vgl. Abb. 10). Der Rezeptor war in allen Fällen überwiegend an der Zellmembran lokalisiert. Einige der Präparate, wie B-Zell-Lymphome oder Merkelzell-Karzinome, weisen eine besonders intensive Färbung auf. Bei allen gezeigten Präparaten wurde der CXCR4 im angrenzenden Normalgewebe nicht oder nur schwach detektiert.

Obwohl in der Abbildung 10 jeweils nur ein Ausschnitt der Tumore gezeigt ist, lässt sich sehr gut erkennen, dass die Expression des CXCR4 oftmals nicht homogen erscheint, das heißt, der CXCR4 wird von einem zusammenhängenden Bereich Zellen stärker exprimiert. Das wird besonders beim abgebildeten Karzinom der Harnblase (Abb. 10 C), dem SCLC (Abb. 10 D) und dem atypischen Karzinom der Lunge (AC) (Abb. 10 E) deutlich. Vor allem beim SCLC scheint die Rezeptorexpression mit zunehmender Entfernung vom Gefäß graduell abzunehmen.



**Abb. 10:** Expression des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Vergrößerung 10x63. Bei I zusätzlich Darstellung der Peptidneutralisation im oberen rechten Rahmen. Größenbalken: 100 µm.

Obwohl es sich beim CXCR4, als GPCR, um einen membranständigen Rezeptor handelt, wird beim abgebildeten Leiomyosarkom (Abb. 10 I) deutlich, dass der Rezeptor auch im Bereich des Zytoplasmas detektierbar ist. Die zusätzlich durchgeführte Peptidneutralisation spricht dafür, dass die gezeigte Färbung als spezifisch einzustufen ist. Das deutet darauf hin, dass der CXCR4 bei Tumoren auch zytoplasmatisch auftreten kann.

#### 4.3) Expression des CXCR4 in BP-NETs

Bei der Untersuchung der verschiedenen Tumorentitäten wurde deutlich, dass der CXCR4 in einigen Tumoren wiederholt sehr intensiv detektiert werden konnte, u.a. beim kleinzelligen Bronchialkarzinom (SCLC). Das führte zu der Überlegung, die Expression des CXCR4 auch in anderen neuroendokrinen Lungentumoren (TC, AC), die eine weniger schlechte Prognose haben, zu überprüfen.

### 4.3.1) Charakterisierung der Patientenstichprobe

Der nachfolgenden Tabelle 11 lassen sich die Charakteristika der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patientenstichprobe entnehmen.

**Tab. 11:** Charakterisierung der untersuchten Patientenstichprobe.

Angegeben sind die Gesamtanzahl der untersuchten Proben, aufgegliedert nach Tumorentität (TC, AC, SCLC). Weiterhin sind Alter und Geschlechterverhältnis angegeben. Für Alter und Überleben sind zudem die verschiedenen Lagemaße aufgeführt.

|                                    | <b>TC</b>     | <b>AC</b>     | <b>SCLC</b>   |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| Gesamtprobenanzahl                 | 26            | 30            | 34            |
| IRS + mRNA-Daten                   | 17            | 17            | 17            |
| Nur IRS-Daten                      | 5             | 10            | 11            |
| Nur mRNA-Daten                     | 2             | 2             | 5             |
| Keine CXCR4-Daten                  | 2             | 1             | 1             |
| <b>Geschlecht</b>                  |               |               |               |
| Weiblich                           | 19            | 15            | 12            |
| Männlich                           | 7             | 15            | 22            |
| <b>Alter (Jahre)</b>               |               |               |               |
| Median                             | 62,8          | 62,1          | 59,6          |
| Mittelwert                         | 59,9          | 58,3          | 59,9          |
| Minimum                            | 18,2          | 18,2          | 43,4          |
| Maximum                            | 81,0          | 76,4          | 79,6          |
| Standardabweichung                 | 14,9          | 15,3          | 9,4           |
| <b>Gesamt-Überleben (Monate)</b>   | <b>(n=26)</b> | <b>(n=30)</b> | <b>(n=26)</b> |
| Median                             | 80,7          | 89,7          | 21,5          |
| Mittelwert                         | 80,2          | 80,8          | 32,9          |
| Minimum                            | 3,9           | 3,5           | 0,1           |
| Maximum                            | 129,2         | 137,2         | 119,0         |
| Standardabweichung                 | 31,7          | 41,2          | 32,8          |
| <b>3-Jahres-Überleben (Monate)</b> | <b>(n=26)</b> | <b>(n=29)</b> | <b>(n=26)</b> |
| Median                             | 36,0          | 36,0          | 21,5          |
| Mittelwert                         | 34,8          | 32,8          | 21,4          |
| Minimum                            | 3,9           | 3,5           | 0,1           |
| Maximum                            | 36,0          | 36,0          | 36,0          |
| Standardabweichung                 | 6,3           | 8,4           | 13,4          |
| <b>5-Jahres-Überleben (Monate)</b> | <b>(n=19)</b> | <b>(n=27)</b> | <b>(n=25)</b> |
| Median                             | 60,0          | 60,0          | 20,1          |
| Mittelwert                         | 57,0          | 51,7          | 26,2          |
| Minimum                            | 3,9           | 3,5           | 0,1           |
| Maximum                            | 60,0          | 60,0          | 60,0          |
| Standardabweichung                 | 12,9          | 17,4          | 21,0          |

### 4.3.2) Immunhistochemische Detektion des CXCR4

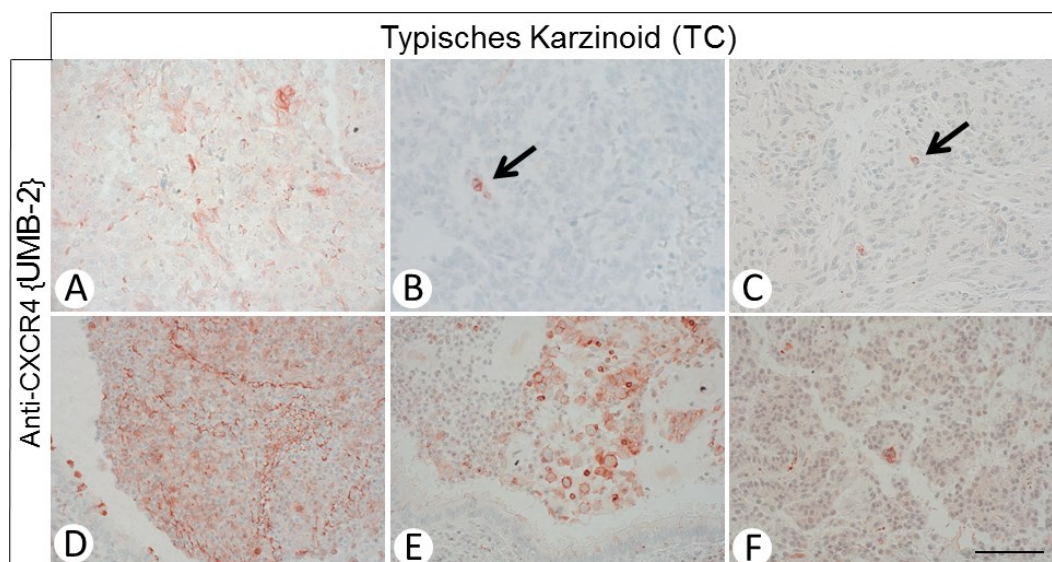
Von einigen Patienten standen mehrere Tumorpräparate für die Bewertung der CXCR4-Expression zur Verfügung. Der für die statistische Auswertung genutzte IRS-Wert ist der Mittelwert aller Präparate, der auf eine ganze Zahl gerundet wurde. Bei



den exemplarisch gezeigten Färbungen der Tumore ist jeweils die Schnittnummer vermerkt sowie der für diesen Schnitt ermittelte IRS.

#### 4.3.2.1) *Typisches Karzinoid (TC)*

Bei den TCs (n=22) wurde eine Expression des CXCR4 nur in wenigen Fällen beobachtet, wobei in der Regel wenige Zellen im Präparat eine positive Färbung zeigten, die zum Teil jedoch sehr intensiv war (vgl. Abb. 11 und 14).

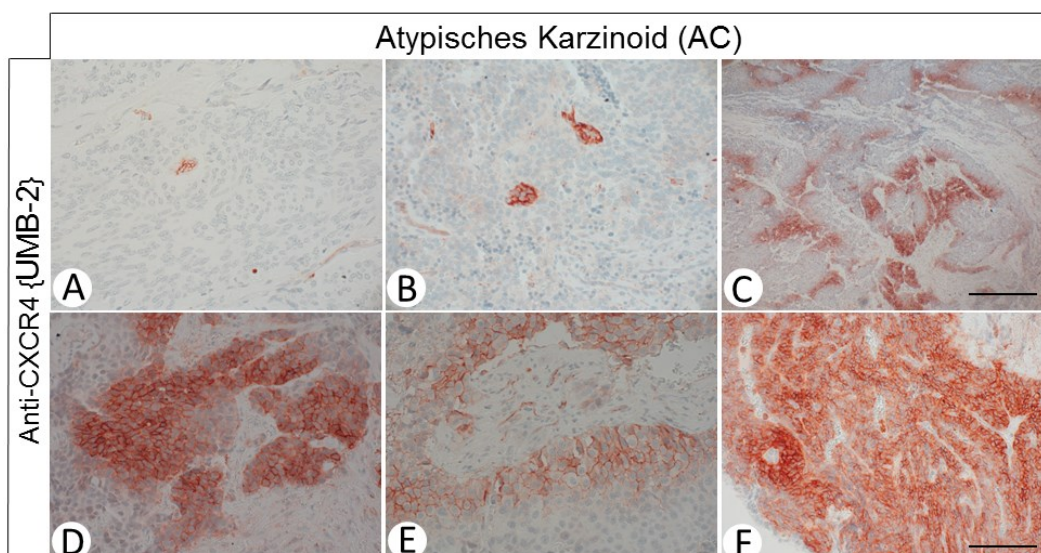


**Abb. 11:** CXCR4-Expression in TC.

Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung A-F: 10x40. **A:** Präparat 5525/04/2b, IRS=3. **B:** Präparat 14419/03/3b, IRS=3. **C:** Präparat E33/06/SS, IRS=3. **D-F:** Schnittfolge 8828/07, Gesamt-IRS=5 bei 6 ausgewerteten Präparaten. **D und E:** Schnitt 2c, IRS=6. **F:** Schnitt SS, IRS=3. Die Pfeile deuten jeweils auf eine kleine, intensiv gefärbte Zellansammlung. Größenbalken: 100 µm.

#### 4.3.2.2) *Atypisches Karzinoid (AC)*

Verglichen mit den TCs konnte für die untersuchten Präparate des ACs (n=27) eine tendenziell stärkere Expression des CXCR4 festgestellt werden. Die für den Großteil der Präparate ermittelten IRS-Werte lagen zwischen null und zwei. Diese Werte sind als negativ bzw. sehr gering einzustufen. Bei zwei der untersuchten Präparate konnte jedoch eine starke Expression des CXCR4 festgestellt werden (vgl. Abb. 12 und 14).

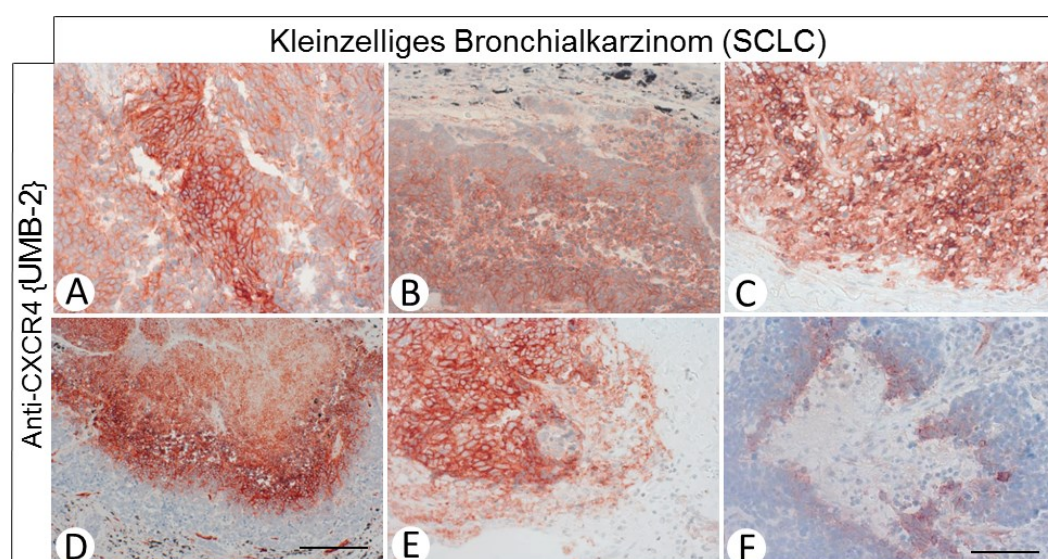


**Abb. 12:** CXCR4-Expression in AC.

Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung A-B, D-F: 10x40, C: 10x10. **A:** Schnitt 14557/05/2a, IRS=3. **B:** Schnitt 1809/07/5, IRS=3. **C** und **D:** Schnitt 4191/08/4b, IRS=6. **E:** Schnitt 4191/08/2, IRS=3. **F:** Schnitt 6913/06/3, IRS=12. Größenbalken: 100 µm (A-B, D-F), 400 µm (C).

#### 4.3.2.3) Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC)

Beim SCLC (n=28) konnte bei der Mehrzahl der untersuchten Präparate eine starke bzw. sehr starke Expression des CXCR4 (IRS  $\geq 6$ ) festgestellt werden. Über die Hälfte aller Schnitte wurde mit einem IRS von neun oder höher bewertet. Jedoch wurde bei vier Präparaten keine Expression des CXCR4 festgestellt. Häufig trat die Expression des Rezeptors relativ großflächig auf (vgl. Abb. 13 und 14).



**Abb. 13:** CXCR4-Expression in SCLC.

Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Originalvergrößerung A-C, E-F: 10x40, D: 10x20. **A:** Schnitt 4838/07/1, IRS=12. **B:** Schnitt 14797/04/2a, IRS=12. **C:** Schnitt 2374/09/3a, IRS=12. **D:** Schnitt 3579/04/1b, IRS=9. **E:** Schnitt 3113/05/2c, IRS=12. **F:** Schnitt 4056/09/1, IRS=3. Größenbalken: 100 µm (A-C, E-F), 200 µm (D).

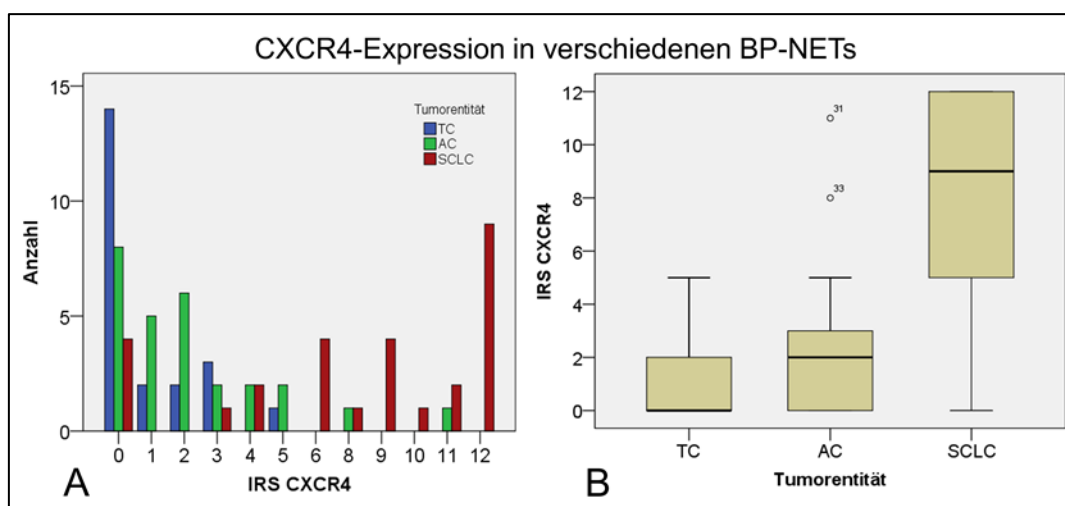
### 4.3.3) Statistische Auswertung der CXCR4-Expression

Für die statistische Auswertung wurden die mit dem IRS ermittelten Werte genutzt.

Die Berücksichtigung kleiner, intensiv gefärbter Areale sowie die relativ einfache Anwendung und Übersichtlichkeit sprechen für seine Nutzung. Auch in anderen Studien hat er sich in der immunhistochemischen Bewertung von Neuropeptidrezeptoren wie den Somatostatin-Rezeptoren bewährt (Specht et al. 2015).

#### 4.3.3.1) Ausmaß der CXCR4-Expression in verschiedenen BP-NETs

In der nachstehenden Abbildung 14 sind Anzahl und Stärke des jeweils ermittelten IRS für die verschiedenen BP-NETs gemeinsam in einem Diagramm dargestellt. Es wird deutlich, dass sich die TCs und ACs nur wenig unterscheiden, wohingegen die Expression des CXCR4 beim SCLC wesentlich stärker ist.



**Abb. 14:** Vergleichende Darstellung des IRS bei TC, AC und SCLC.

**A:** Balkendiagramm. Die Anzahl der Fälle sowie der ermittelte IRS sind für die jeweilige Tumorentität angegeben. **B:** Box-Plot-Diagramm. Dargestellt sind der Median, das obere und untere Quartil, Minimal- und Maximalwert sowie Ausreißer.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests konnte gezeigt werden, dass für den IRS (n=77) keine Normalverteilung vorliegt, da die Irrtumswahrscheinlichkeit bei  $p \leq 0,05$  liegt, so dass die Nullhypothese (Normalverteilung) abgelehnt werden muss.

Der Kruskal-Wallis-Test erlaubt eine Aussage darüber, ob zwischen den verschiedenen Tumorentitäten ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Expressionsstärke des CXCR4 besteht. Die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  (n=77) spricht für einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den drei Tumorentitäten.

Um TC und AC, TC und SCLC bzw. AC und SCLC miteinander zu vergleichen, wurde jeweils ein Mann-Whitney-U-Test gerechnet. Dadurch konnte gezeigt werden, dass sich die Ausprägung der IRS-Werte beim SCLC signifikant von der bei TC und AC un-

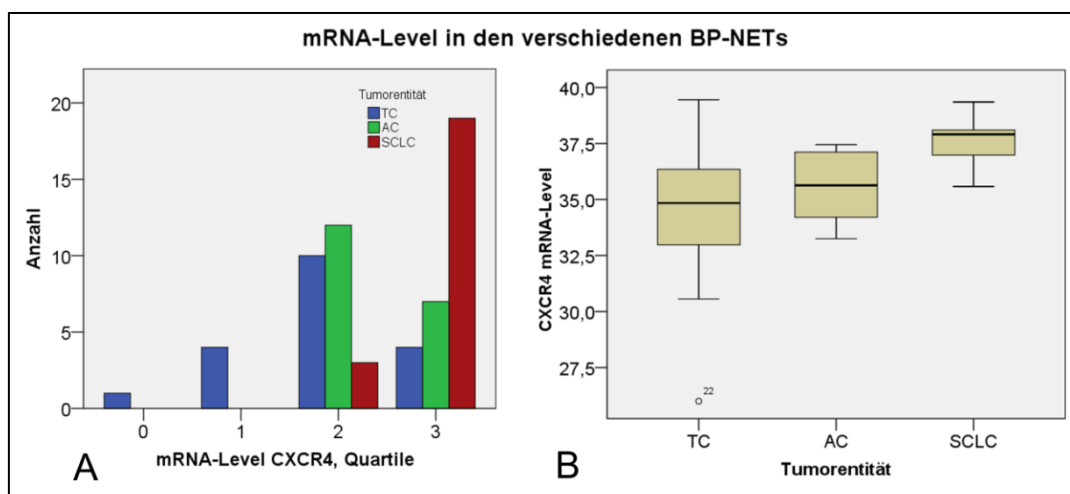
terscheidet. Doch auch zwischen AC und TC fand sich ein signifikanter Unterschied (vgl. Tab. 12).

**Tab. 12:** Mann-Whitney-U-Tests. Prüfvariable: IRS.

|                               | IRS    |
|-------------------------------|--------|
| <b>TC vs. AC</b>              |        |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | 0,028  |
| <b>TC vs. SCLC</b>            |        |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | <0,001 |
| <b>AC vs. SCLC</b>            |        |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | <0,001 |

#### 4.3.3.2) CXCR4-mRNA-Level in verschiedenen BP-NETs

Die nachstehende Abbildung 15 gibt die innerhalb der verschiedenen BP-NET-Tumorentitäten ermittelten, in Quartile unterteilten (vgl. Tab. 9), CXCR4-mRNA-Level grafisch wieder.



**Abb. 15:** mRNA-Level innerhalb der verschiedenen BP-NETs, n=60.

**A:** Balkendiagramm, gruppierte mRNA-Level, Expressionshöhe aufgeteilt nach Tumorentität. **B:** Box-Plot, ungruppierte mRNA-Level.

Anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests ließ sich ermitteln, dass nur die Werte der nicht klassifizierten mRNA-Level (n=60, p=0,066) normalverteilt vorliegen, die der in Quartile eingeteilten (n=60, p<0,001) jedoch nicht.

Die Existenz signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich des mRNA-Levels (n=60), gruppiert und ungruppiert, konnte mit Hilfe eines Kruskal-Wallis-Tests aufgezeigt werden. Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag jeweils bei p<0,001.

Mit Hilfe der Mann-Whitney-U-Tests konnte gezeigt werden, dass zwischen den Proben von AC und TC kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des CXCR4-mRNA-Levels besteht. Jedoch unterscheiden sich beide Gruppen signifikant von der SCLC-Gruppe (vgl. Tab. 13).

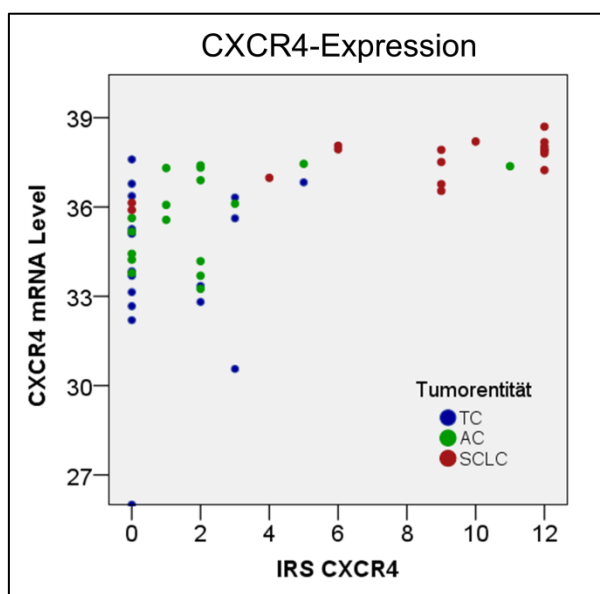


**Tab. 13:** Mann-Whitney-U-Tests. Prüfvariablen: mRNA-Level und mRNA-Level gruppiert.

|                               | mRNA-Level | mRNA-Level<br>gruppiert (Quartile) |
|-------------------------------|------------|------------------------------------|
| <b>TC vs. AC</b>              |            |                                    |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | 0,103      | 0,091                              |
| <b>TC vs. SCLC</b>            |            |                                    |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | <0,001     | <0,001                             |
| <b>AC vs. SCLC</b>            |            |                                    |
| Asymp. Signifikanz (2-seitig) | <0,001     | 0,001                              |

#### 4.3.3.3) Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Level

Die nachstehende Abbildung 16 gibt einen grafischen Überblick über den Zusammenhang zwischen der CXCR4-Protein-Expression (Ermittlung mittels IRS) und dem entsprechenden mRNA-Level bei TC, AC und SCLC. Es wird deutlich, dass ein hoher IRS mit einem hohen mRNA-Level assoziiert ist. Proben mit einem niedrigen IRS



**Abb. 16:** Korrelation zwischen IRS und mRNA-Level in Abhängigkeit von der Tumorentität (n=51). Streudiagramm.

weisen jedoch nicht automatisch einen niedrigen mRNA-Level auf. Die Berechnung von **Spearman's-Rho** für alle Tumorentitäten ergab einen Wert von  **$r=0,691$**  ( $p<0,001$ ), was als mittelstarke Korrelation zu interpretieren ist. Bei der Einzelanalyse der Tumorentitäten ergab sich jedoch nur beim SCLC eine signifikante Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Level ( $r=0,51$ ;  $p=0,037$ ). In der nachfolgenden Tabelle 14 sind alle Lagemaße von IRS und mRNA-Level für die untersuchten BP-NETs zusammengefasst.

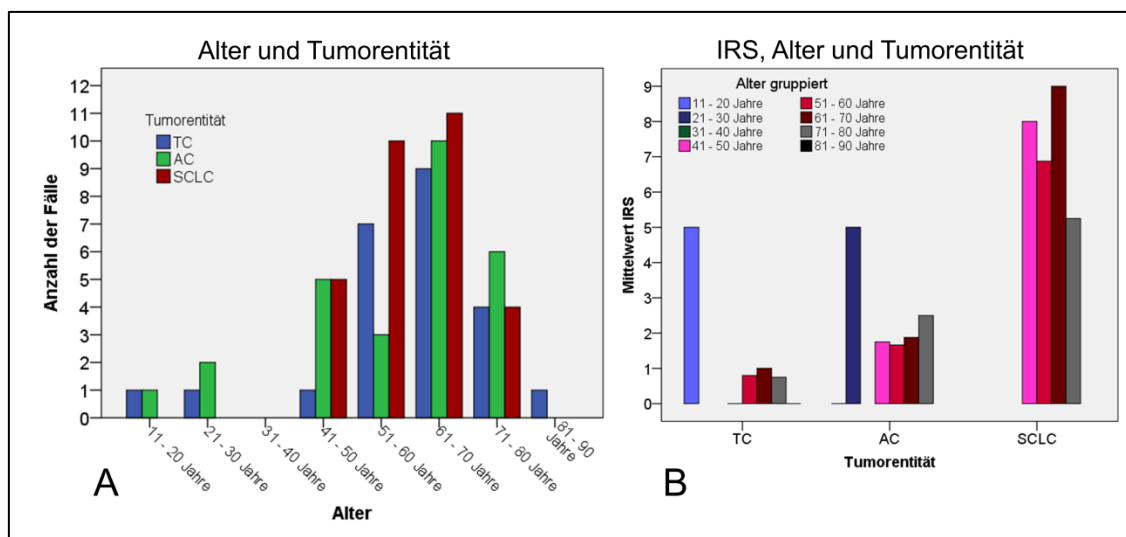
**Tab. 14:** Lagemaße für IRS und mRNA-Level bei AC, TC und SCLC.

|                               | TC    | AC    | SCLC  |
|-------------------------------|-------|-------|-------|
| <b>CXCR4-Expression (IRS)</b> |       |       |       |
| Median                        | 0     | 2,00  | 9,00  |
| Mittelwert                    | 0,91  | 2,22  | 7,82  |
| Minimum                       | 0     | 0     | 0     |
| Maximum                       | 5,00  | 11,00 | 12,00 |
| Standardabweichung            | 1,44  | 2,64  | 4,30  |
| <b>mRNA-Level</b>             |       |       |       |
| Median                        | 34,84 | 35,63 | 37,9  |
| Mittelwert                    | 34,34 | 35,59 | 37,5  |
| Minimum                       | 26,00 | 33,25 | 35,58 |
| Maximum                       | 39,45 | 37,45 | 39,35 |
| Standardabweichung            | 2,96  | 1,53  | 1,00  |

#### 4.3.3.4) Einfluss von Alter und Geschlecht

##### Alter

Die nachstehenden Abbildungen 17 A und B geben einen grafischen Eindruck sowohl über die Altersverteilung innerhalb der untersuchten BP-NETs (A) als auch über die Stärke der Rezeptorexpression (IRS) in Abhängigkeit vom Alter (B).



**Abb. 17:** Altersverteilung bei TC, AC und SCLC sowie mittlerer IRS in Abhängigkeit von der Tumorentität und dem Alter.

**A:** Übersicht über die Altersverteilung bei TC, AC und SCLC (n=81). **B:** Expressionsstärke des CXCR4 (Mittelwert IRS) bei den untersuchten Tumorentitäten innerhalb der verschiedenen Altersklassen (n=69).

Es wird deutlich, dass BP-NETs innerhalb der Altersgruppen 51 bis 70 Jahre am häufigsten auftreten. Beim TC und beim AC sind im Gegensatz zum SCLC auch sehr junge Patienten zu finden. Der Mittelwert des IRS ist innerhalb der jeweiligen Tumorentität

bei diesen jungen Altersgruppen vergleichsweise hoch, dagegen liegen die Mittelwerte der anderen Altersgruppen jeweils relativ nah beieinander.

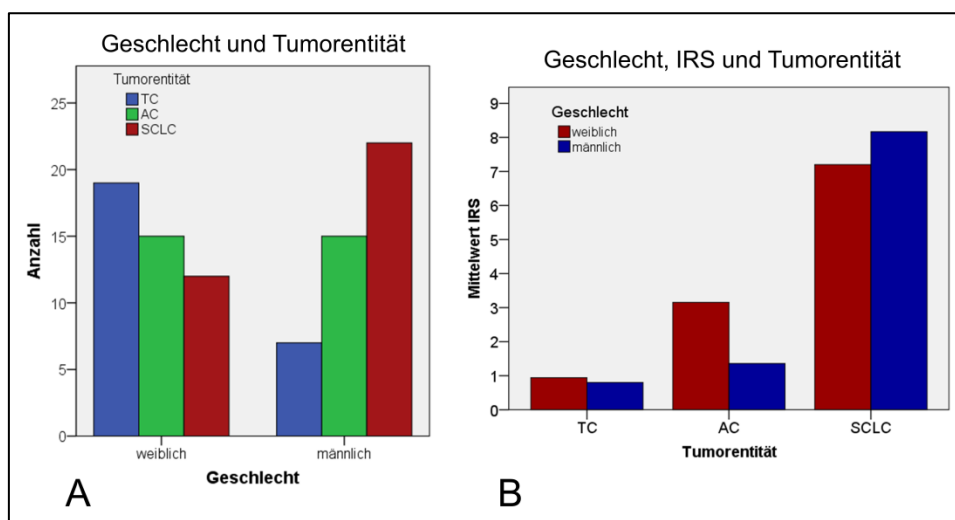
Der durchgeführte **Kruskal-Wallis-Test** (Gruppierungsvariable: Tumorentität) über die Variable „Alter“ gerechnet, verdeutlicht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,796$ , dass sich die Tumorentitäten hinsichtlich des Alters nicht signifikant voneinander unterscheiden. Ein durchgeführter Log-Rank-Test bestätigt mit  $p=0,259$  bei einer dekadischen Altersgruppierung wie in Abbildung 17, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Überleben und dem Alter besteht.

### Geschlecht

Die nachstehende Abbildung 18 gibt den geschlechtsspezifischen mittleren IRS-Wert für die jeweiligen Tumorentitäten wieder.

Abbildung 18 A verdeutlicht, dass in der untersuchten Stichprobe ein TC häufiger bei Frauen auftritt und SCLC häufiger bei Männern, ein AC kommt bei beiden Geschlechtern etwa gleich häufig vor.

Aus Abbildung 18 B lässt sich ablesen, dass beim AC ein vergleichsweise großer Unterschied bezüglich des IRS-Mittelwertes zwischen den Geschlechtern besteht, der jedoch nicht signifikant ist (Kolmogorov-Smirnov-Test:  $p=0,99$ ; Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,58$ ).

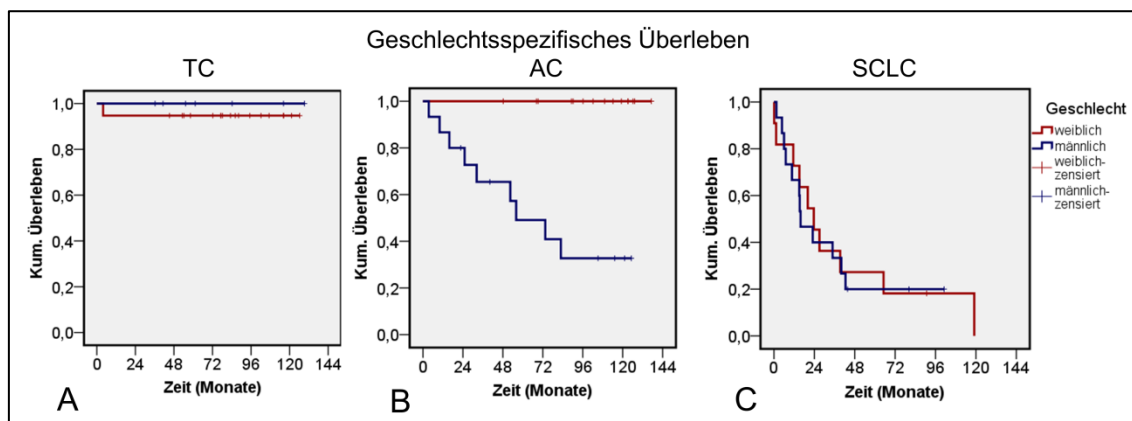


**Abb. 18:** Geschlechtsverteilung bei TC, AC und SCLC sowie Höhe des IRS in Abhängigkeit von der Tumorentität und dem Geschlecht.

**A:** Übersicht über die Geschlechtsverteilung bei TC, AC und SCLC. **B:** Expressionsstärke des CXCR4 (Mittelwert IRS) bei den beiden Geschlechtern innerhalb der drei Tumorentitäten.

Die Betrachtung des geschlechtsspezifischen Überlebens innerhalb der drei untersuchten BP-NETs zeigt, dass die mit SPSS generierten Überlebenskurven beim AC zwischen den beiden Geschlechtern signifikant unterschiedlich sind (Log-Rank-Test:  $p<0,001$ ; Mann-Whitney-U-Test:  $p=0,006$ ), was beim TC und auch beim SCLC nicht

der Fall ist (vgl. Abb. 19 A-C), dementsprechend scheint das geschlechtsspezifische Überleben beim AC nicht mit der Expressionsstärke des CXCR4 assoziiert zu sein. Die Kurvenverläufe für das 3- bzw. 5-Jahres-Überleben sind nicht gezeigt, unterscheiden sich jedoch unwesentlich von den in Abb. 19 dargestellten Kaplan-Meier-Überlebenskurven.



**Abb. 19:** Geschlechtsspezifische Gesamt-Überlebenskurven.

**A:** TC mit weiblich: n=19 und männlich: n=7 (Log-Rank: p=0,544). **B:** AC mit männlich und weiblich: je n=15 (Log-Rank: p<0,001). **C:** SCLC mit weiblich: n=11 und männlich: n=15 (Log-Rank: p=0,883).

#### 4.3.3.5) Überlebensvariablen

Wie im Methodenteil bereits dargelegt (vgl. Kap. 3.14), wurden neben der Variable „Gesamt-Überleben“ zusätzlich die Variablen „3- und 5-Jahres-Überleben“ geschaffen. Die Generierung dieser Variablen ermöglicht die Betrachtung eines definierten Ereignisses (d.h. der Patient ist verstorben oder er hat den genannten Zeitraum überlebt) innerhalb des festgelegten Zeitraums. In der nachfolgenden Tabelle sind die Korrelationen der genannten Überlebensvariablen untereinander dargestellt.

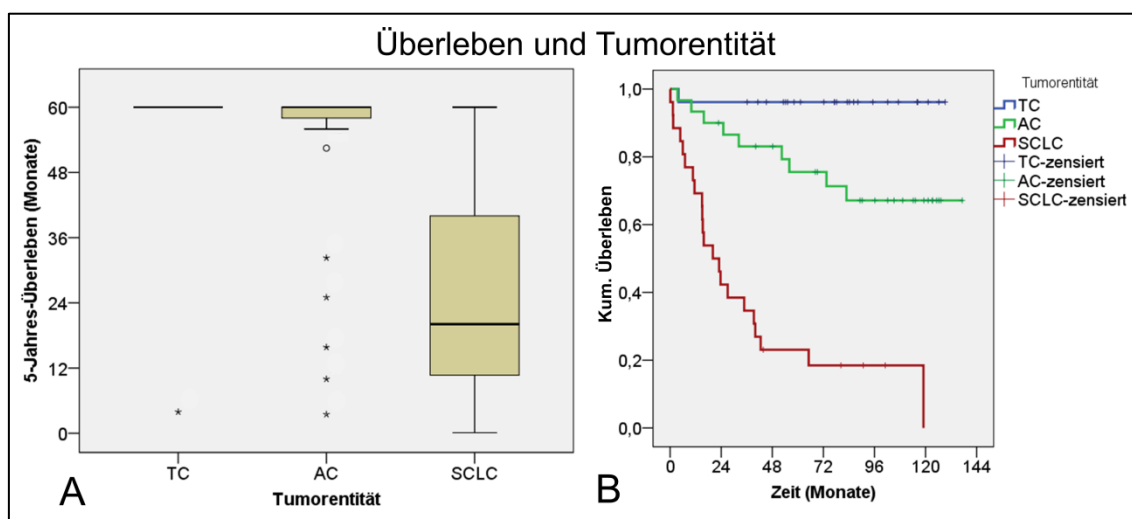
**Tab. 15:** Korrelation der verschiedenen Überlebensvariablen untereinander.

|                    |                        | Gesamt-Überleben | 3-Jahres-Überleben | 5-Jahres-Überleben |
|--------------------|------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| Gesamt-Überleben   | Spearman-Rho           |                  | 0,796              | 0,882              |
|                    | Signifikanz (2-seitig) |                  | <0,001             | <0,001             |
|                    | n                      |                  | 81                 | 71                 |
| 3-Jahres-Überleben | Spearman-Rho           | 0,796            |                    | 0,943              |
|                    | Signifikanz (2-seitig) | <0,001           |                    | <0,001             |
|                    | n                      | 81               |                    | 71                 |
| 5-Jahres-Überleben | Spearman-Rho           | 0,882            | 0,943              |                    |
|                    | Signifikanz (2-seitig) | <0,001           | <0,001             |                    |
|                    | n                      | 71               | 71                 |                    |

Anhand der Tabelle 15 wird ersichtlich, dass das 5-Jahres-Überleben sehr stark mit dem Gesamt-Überleben korreliert. Die Korrelation des 3-Jahres-Überlebens mit dem Gesamt-Überleben ist vergleichsweise schwächer.

#### 4.3.3.6) Tumorentität und Überleben

Durch die Auswertung der erhobenen Daten kann sowohl grafisch (vgl. Abb. 20) als auch rechnerisch gezeigt werden, dass sich das Gesamt-Überleben beim SCLC höchst signifikant von dem bei TC und AC unterscheidet (Kruskall-Wallis-Test:  $p < 0,001$ , Log-Rank-Test  $p < 0,001$ ).



**Abb. 20:** Zusammenhang zwischen Tumorentität und Überleben.

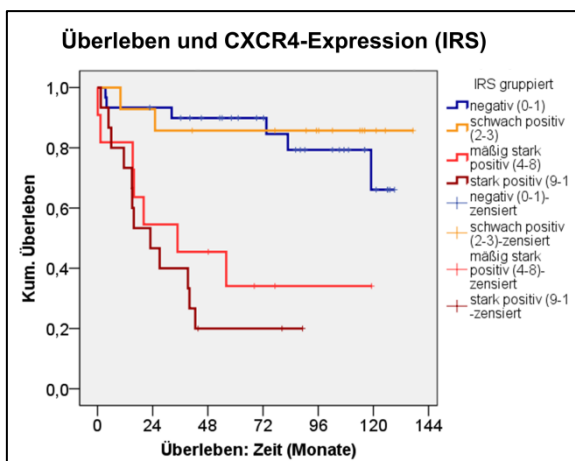
**A:** Box-Plot. 5-Jahres-Überleben hinsichtlich der einzelnen Tumorentitäten. **B:** Kaplan-Meier-Überlebenskurven für die verschiedenen Tumorentitäten hinsichtlich des kumulativen Gesamt-Überlebens.

Abbildung 20 B verdeutlicht, dass das AC hinsichtlich des kumulativen Gesamt-Überlebens zwischen dem TC und dem SCLC angesiedelt ist.

#### 4.3.3.7) CXCR4-Protein-Expression und Überleben

Nachstehende Abbildung 21 gibt einen Eindruck über den Zusammenhang zwischen der CXCR4-Protein-Expression und dem Überleben.

Es wird deutlich, dass ein hoher IRS (gruppiert) mit einem verkürzten kumulativen Gesamt-Überleben assoziiert ist. Es treten jedoch auch einzelne, wenige Fälle auf, bei denen die Überlebenszeit trotz geringem IRS sehr kurz ist. Die gewählte IRS-Gruppierung deutet darauf hin, dass ein IRS von 4 oder höher mit einer verkürzten Überlebenszeit assoziiert zu sein scheint. Der Log-Rank-Test bestätigt mit  $p < 0,001$ , dass sich die verschiedenen Gruppen höchst signifikant voneinander unterscheiden.



**Abb. 21:** Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und dem Überleben. Kaplan-Meier-Überlebenskurven des Gesamt-Überlebens in Abhängigkeit vom gruppierten IRS (n=70).

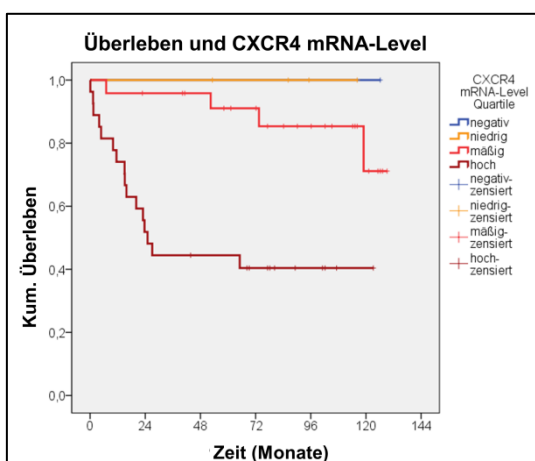
Die Korrelation des jeweiligen Überlebenszeitraums mit dem IRS zeigt, dass die stärkste Korrelation zwischen dem IRS und dem 5-Jahres-Überleben besteht, gefolgt vom Gesamt-Überleben und schlussendlich dem 3-Jahres-Überleben (vgl. Tab. 16). Dementsprechend ist die Korrelation zwischen dem 5-Jahres-Überleben und dem IRS als mittelstark zu interpretieren. Der Zusammenhang des IRS mit den beiden anderen Überlebenszeiträumen ist als schwach zu interpretieren. Alle gezeigten Korrelationen sind signifikant.

**Tab. 16:** Korrelation zwischen dem IRS und den Überlebenszeiträumen.

|     |                        | Gesamt-Überleben | 3-Jahres-Überleben | 5-Jahres-Überleben |
|-----|------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| IRS | Spearman-Rho           | -0,435           | -0,416             | -0,536             |
|     | Signifikanz (2-seitig) | <0,001           | <0,001             | <0,001             |
|     | n                      | 70               | 69                 | 60                 |

#### 4.3.3.8) CXCR4-mRNA-Level und Überleben

Die nachstehende Abbildung 22 bildet mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurve das kumulative Gesamtüberleben für die in Quartile gruppierten mRNA-Level ab. Der ge-



**Abb. 22:** Zusammenhang zwischen dem CXCR4-mRNA-Level und dem Überleben. Kaplan-Meier-Überlebenskurve, Gesamt-Überleben hinsichtlich dem in Quartile gruppierten mRNA-Level (n=56).

rechnete Log-Rank-Test spricht mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  für einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den dargestellten Gruppen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass ein hohes mRNA-Level mit einem kürzeren Überleben assoziiert zu sein scheint.

Die Korrelation des mRNA-Levels mit den verschiedenen Überlebenszeiträumen ergab für alle drei Überlebensvariablen eine signifikante, etwa gleich starke Korrelation, wobei der Zusammenhang als schwach, tendenziell mittelstark, zu inter-

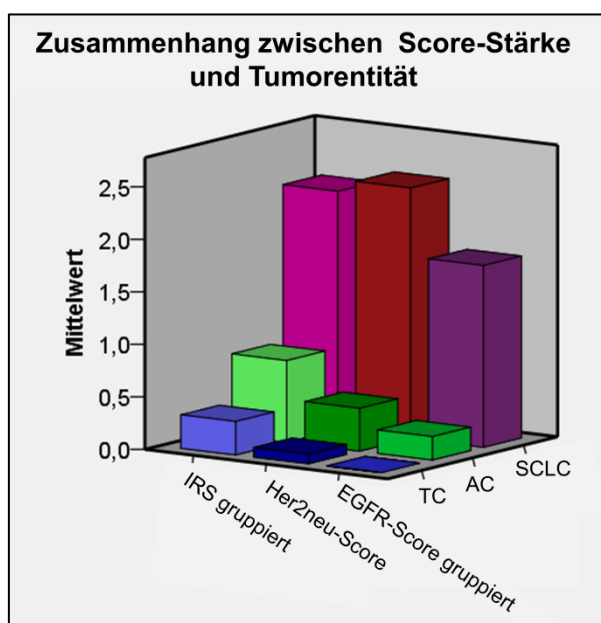
pretieren ist (vgl. Tab. 17).

**Tab. 17:** Korrelation zwischen dem mRNA-Level und den Überlebenszeiträumen.

|            |                        | Gesamt-Überleben | 3-Jahres-Überleben | 5-Jahres-Überleben |
|------------|------------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| mRNA-Level | Spearman-Rho           | -0,455           | -0,475             | -0,451             |
|            | Signifikanz (2-seitig) | <0,001           | <0,001             | 0,001              |
|            | n                      | 56               | 55                 | 50                 |

#### 4.3.4) Vergleich der immunhistochemischen Auswertungs-Scores

Für die Evaluierung der immunhistochemisch detektierten Rezeptorexpression wurden drei verschiedene Bewertungssysteme genutzt, der IRS, der EGFR-Score und der Her2neu-Score. Um einen anschaulichen Vergleich zwischen den drei Scores zu ermöglichen, wurde neben dem IRS auch der EGFR-Score, der Werte zwischen 0 und 300 aufweisen kann, gruppiert (vgl. Kap. 3.12).



**Abb. 23:** Grafischer Vergleich der Score-Systeme. Darstellung der mittleren Werte, die bei der Bewertung der CXCR4-Expression mit Hilfe der Score-Systeme IRS, EGFR-Score und Her2neu-Score ermittelt wurden.

Die Mittelwerte der Scores sind jeweils für die drei untersuchten Tumorentitäten getrennt dargestellt.

Die nebenstehende Abbildung 23 gibt die ermittelten Werte grafisch wieder. Es ist ersichtlich, dass in allen drei Score-Systemen beim SCLC jeweils die höchsten Werte erreicht worden sind.

In Tabelle 18 sind die Korrelationen für die verschiedenen, nicht-grupperten Scores untereinander aufgeführt. Es wird deutlich, dass der IRS und der EGFR-Score mit  $r=0,959$  ( $p<0,001$ ) nahezu perfekt miteinander korrelieren. Mit dem Her2neu-Score korrelieren der IRS und der EGFR-Score vergleichsweise schwächer, aber dennoch stark. Die Korrelation der verschiedenen ungruppierten Auswertungs-Scores mit dem mRNA-Level ergab für den IRS und den

EGFR-Score jeweils eine mittelstarke Korrelation, der HER2neu-Score hingegen zeigte einen vergleichsweise stärkeren Zusammenhang (vgl. Tab. 19).

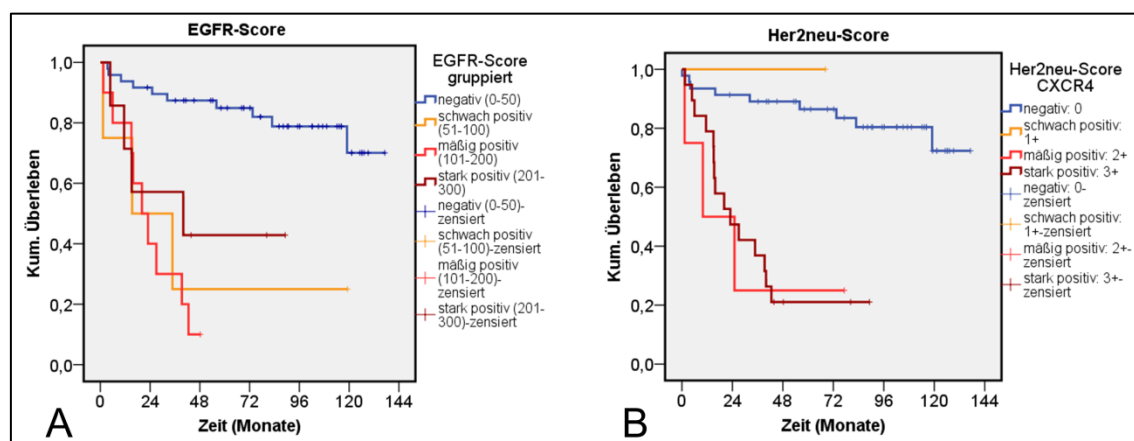
**Tab. 18:** Korrelationen zwischen den Scores (IRS, EGFR, Her2neu), die zur Ermittlung der Stärke der CXCR4-Rezeptorexpression genutzt worden sind (n=77).

|               |                        | IRS    | EGFR-Score | Her2neu-Score |
|---------------|------------------------|--------|------------|---------------|
| IRS           | <b>Spearman-Rho</b>    |        | 0,959      | 0,830         |
|               | Signifikanz (2-seitig) |        | <0,001     | <0,001        |
| EGFR-Score    | <b>Spearman-Rho</b>    | 0,959  |            | 0,787         |
|               | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 |            | <0,001        |
| Her2neu-Score | <b>Spearman-Rho</b>    | 0,830  | 0,787      |               |
|               | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 | <0,001     |               |

**Tab. 19:** Korrelation der verschiedenen Auswertungs-Scores mit dem mRNA-Level (n=51).

|                  |                        | IRS    | EGFR-Score | Her2neu-Score |
|------------------|------------------------|--------|------------|---------------|
| CXCR4 mRNA-Level | <b>Spearman-Rho</b>    | 0,691  | 0,659      | 0,768         |
|                  | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 | <0,001     | <0,001        |

Die Überlebenskurven, die basierend auf den Werten des EGFR-Scores (gruppiert) bzw. Her2neu-Scores erstellt wurden, unterscheiden sich nur geringfügig voneinander (vgl. Abb. 24).



**Abb. 24.** Überlebenskurven für das Gesamt-Überleben, basierend auf dem EGFR-Score (A) oder dem Her2neu-Score (B).

Die Kurven der niedrigen, gruppierten Score-Werte verlaufen jeweils sehr ähnlich. Die zum schwach positiven und mäßig positiven Her2neu-Score zugehörigen Kurven sowie die des schwach positiven EGFR-Scores sollten aufgrund der geringen Fallzahl (vgl. Tab. 20) von der Betrachtung ausgeschlossen werden. Der durchgeführte Log-Rank-Test ergab für beide Scores eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$ . Dementsprechend unterscheiden sich die Gruppen, basierend auf der Höhe der jeweiligen Score-Werte, hinsichtlich des Gesamt-Überlebens höchst signifikant voneinander.



**Tab. 20:** Verarbeitete Fälle zur Erzeugung der kumulativen Überlebenskurven, basierend auf dem Gesamt-Überleben (EGFR-Score, Her2neu-Score).

| EGFR-Score gruppiert       | Gesamtzahl | Anzahl der Ereignisse (Todesfälle) | Zensiert |         |
|----------------------------|------------|------------------------------------|----------|---------|
|                            |            |                                    | H        | Prozent |
| negativ (0-50)             | 49         | 11                                 | 38       | 77,6%   |
| schwach positiv (51-100)   | 4          | 3                                  | 1        | 25,0%   |
| mäßig positiv (101-200)    | 10         | 9                                  | 1        | 10,0%   |
| stark positiv (201-300)    | 7          | 4                                  | 3        | 42,9%   |
| insgesamt                  | 70         | 27                                 | 43       | 61,4%   |
| <b>Her2neu-Score CXCR4</b> |            |                                    |          |         |
| negativ: 0                 | 46         | 9                                  | 37       | 80,4%   |
| schwach positiv: 1+        | 1          | 0                                  | 1        | 100,0%  |
| mäßig positiv: 2+          | 4          | 3                                  | 1        | 25,0%   |
| stark positiv: 3+          | 19         | 15                                 | 4        | 21,1%   |
| insgesamt                  | 70         | 27                                 | 43       | 61,4%   |

Bei der Korrelation der drei Auswertungs-Scores mit den verschiedenen Variablen der Überlebenszeit konnte für alle drei immunhistochemischen Auswertungssysteme jeweils ein höchst signifikanter Zusammenhang aufgezeigt werden. Die stärkste Korrelation, die für alle Überlebensvariablen als mittelstark zu interpretieren ist, wurde jeweils für den Her2neu-Score gefunden (vgl. Tab. 21). Der EGFR-Score wies stets die vergleichsweise geringste Korrelation auf. Die stärksten Zusammenhänge zwischen Überleben und IRS wurden mit der Variable „5-Jahres-Überleben“ ermittelt.

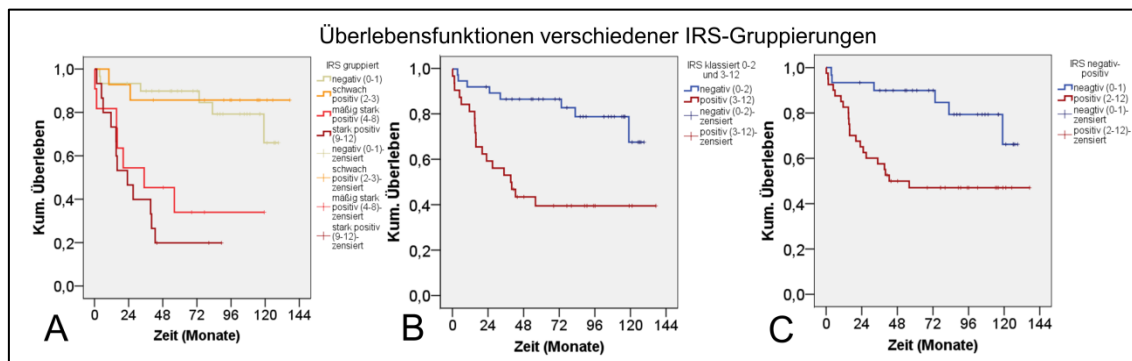
**Tab. 21:** Korrelation der Auswertungs-Scores mit den verschiedenen Überlebenszeiträumen.

|                           |                        | IRS    | EGFR-Score | Her2neu-Score |
|---------------------------|------------------------|--------|------------|---------------|
| <b>Gesamt-Überleben</b>   | <b>Spearman-Rho</b>    | -0,435 | -0,415     | -0,570        |
|                           | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 | <0,001     | <0,001        |
|                           | n                      | 70     |            |               |
| <b>3-Jahres-Überleben</b> | <b>Spearman-Rho</b>    | -0,416 | -0,362     | -0,505        |
|                           | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 | 0,002      | <0,001        |
|                           | n                      | 69     |            |               |
| <b>5-Jahres-Überleben</b> | <b>Spearman-Rho</b>    | -0,536 | -0,470     | -0,614        |
|                           | Signifikanz (2-seitig) | <0,001 | <0,001     | <0,001        |
|                           | n                      | 60     |            |               |

#### 4.3.5) Cut-off-Werte: Klassifizierung der Auswertungs-Scores

Die Errechnung einer Klassierung und dementsprechend eines Cut-off-Wertes mit Hilfe von SPSS ist nur mit der Variable „Gesamt-Überleben“ möglich gewesen. Für das 3- und 5-Jahres-Überleben war es aufgrund einer nur schwachen bzw. keiner Assoziation zwischen den Variablen nicht möglich, eine Klassierung zu bilden.

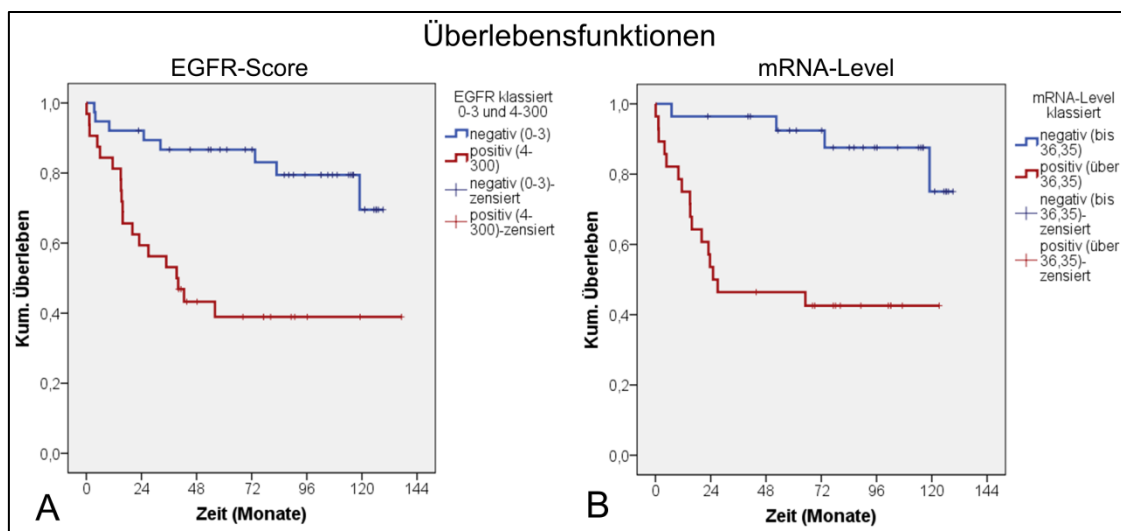
**IRS:** SPSS schlägt für eine Klassierung des IRS in Bezug auf die Gesamt-Überlebenszeit den Wert 2 vor. D.h. ein IRS von 3 oder höher ist mit einem schlechteren Überleben assoziiert. Nachfolgend sind drei Überlebenskurven, basierend auf verschiedenen Gruppeneinteilungen dargestellt (vgl. Abb. 25).



**Abb. 25:** Überlebenskurven, basierend auf verschiedenen gruppierten IRS.

**A:** 4 Gruppen (ocker: 0-1; orange: 2-3; rot: 4-8; dunkelrot: 9-12). Log-Rank:  $p < 0,001$ . **B:** 2 Gruppen, niedrig (blau, IRS=0-2) und hoch (rot, IRS=3-12), entspricht der vorgeschlagenen SPSS-Klassierung. Log-Rank:  $p = 0,001$ . **C:** 2 Gruppen, negativ (blau, IRS=0-1) und positiv (rot, IRS=2-12). Log-Rank:  $p = 0,005$ .

Die ermittelten Werte des Log-Rank-Tests für die Überlebenskurven verdeutlichen, dass sich die IRS-Gruppierungen unabhängig von der jeweils gewählten Einteilung signifikant voneinander unterscheiden.



**Abb. 26:** Überlebenskurven, basierend auf den SPSS-Klassierungen.

**A:** Klassierter EGFR-Score. 2 Gruppen (blau: 0-3 und rot: 4-300), Log-Rank:  $p < 0,001$ . **B:** Klassierter m-RNA-Level. 2 Gruppen (blau: 0-36,35 und rot: 36,36-40), Log-Rank:  $p < 0,001$ .

**EGFR-Score:** Eine SPSS-basierte Klassierung für den EGFR-Score ergab einen Wert von 3, dementsprechend ist ein EGFR-Wert von 4 oder höher mit einer schlechteren Prognose für den Patienten assoziiert (vgl. Abb. 26 A).

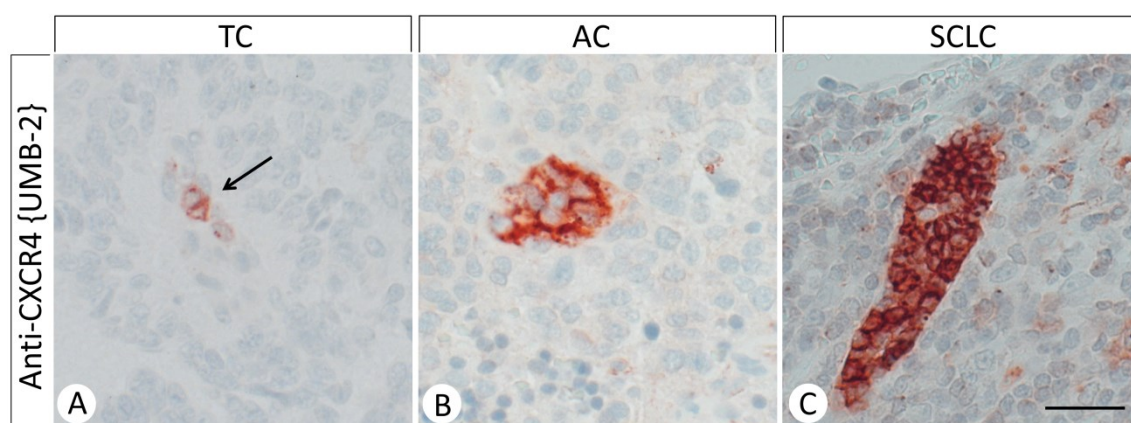
**Her2neu-Score:** Aufgrund einer nur schwachen bzw. keiner Assoziation zwischen dem Her2neu-Score und der Leitvariable Überlebenszeit, wurde von SPSS kein Wert für eine mögliche Klassierung ausgegeben.

**mRNA-Level:** Hier schlägt SPSS 36,35 als Grenzwert vor (vgl. Abb. 26 B).

Ein Log-Rank-Wert für die in Abbildung 26 dargestellten Überlebenskurven von  $p < 0,001$  bestätigt rechnerisch, dass sich die gezeigten Gruppen höchst signifikant voneinander unterscheiden.

#### 4.4) Expressionsmuster

Bei der histologischen Auswertung der Tumorproben in der vorliegenden Arbeit und bei der Evaluation maligner Gewebeproben in einer früheren Arbeit (Diplomarbeit Ch. Reimann: Der Chemokinrezeptor CXCR4 und seine Expression in normalem und neoplastischem Gewebe. FSU Jena, 2012) konnte das Auftreten bestimmter Expressionsmuster wiederholt festgestellt werden. Die nachfolgenden Abbildungen 27-29 zeigen diese exemplarisch.

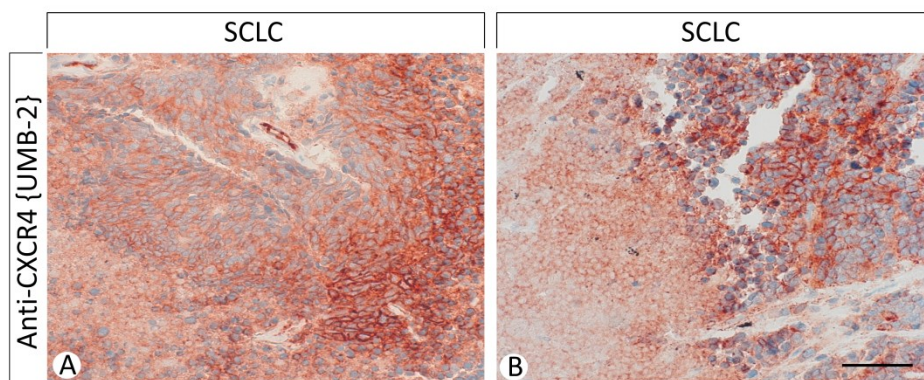


**Abb. 27:** Punktuelle Expression des CXCR4 bei TC, AC und SCLC.

**A:** 14419/03/3b. **B:** 1809/07/5. **C:** 14350/07/4a. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Vergrößerung: 10x40. Größenbalken: 50 µm.

Bei den einzelnen stark exprimierenden Zellansammlungen, die bei allen drei untersuchten Tumorentitäten der BP-NETs gefunden werden konnten, könnte es sich um Krebsstammzellen (CSCs) handeln. Die Abbildung 27 lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen Größe der Zellansammlung und der Tumorentität besteht. Es ist ersichtlich, dass sich die Zellen, die den CXCR4 exprimieren, deutlich vom umgebenden Tumorgewebe abgrenzen.

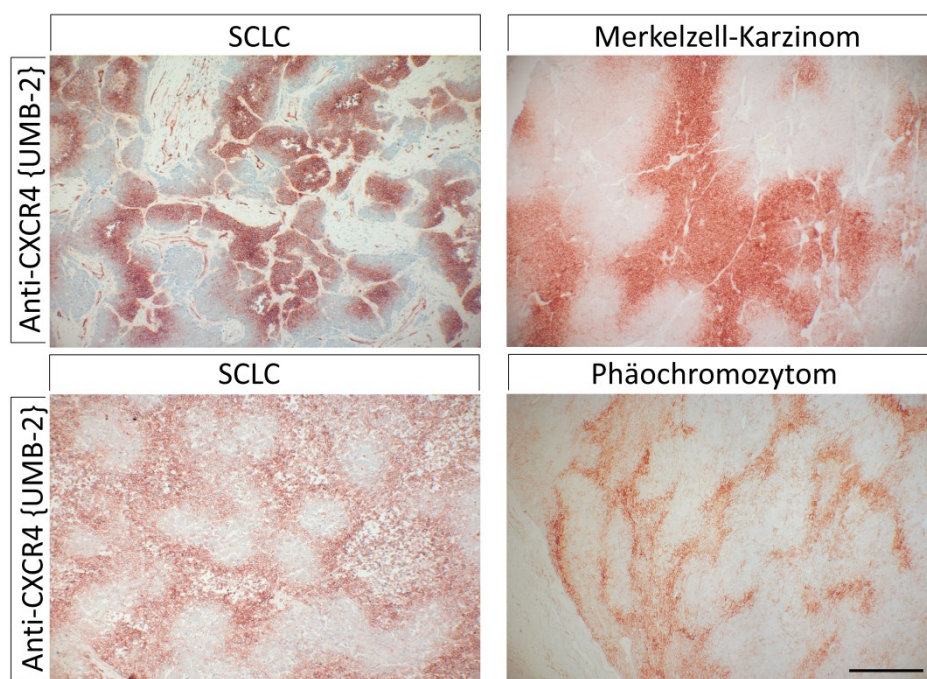
Hypoxische Bedingungen können im immunhistochemisch gefärbten Präparat gut anhand von Nekrosen erkannt werden. Wie in der nachfolgenden Abbildung 28 dargestellt, ist bei den nekrotischen Zellen die Expression des CXCR4 gut zu erkennen, außerdem ist die Färbung um die Nekrose besonders intensiv.



**Abb. 28:** Expression des CXCR4 in und um Tumornekrosen.

**A:** 14797/04/2a. **B:** 5379/04/1b. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Vergrößerung: 10x40. Größenbalken: 80 µm.

Wiederholt konnte eine inhomogene Immunfärbung beobachtet werden, die sich scheinbar in konzentrischen Wellen über das Präparat erstreckt. Auf der nachfolgenden Abbildung 29 sind beispielhafte Gewebeschnitte gezeigt.



**Abb. 29:** Inhomogene Expression des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren.

Gezeigt sind Proben von vier verschiedenen Patienten. Immunhistochemie, Gegenfärbung mit Hämatoxylin, Vergrößerung: 10x10. Größenbalken: 400 µm.

Es wird deutlich, dass sich die ungefärbten und gefärbten Bereiche relativ scharf voneinander abgrenzen; die Überganszone von gefärbt zu ungefärbt umfasst nur einige wenige Zellen, deren Färbung graduell abgestuft ist. Die gezeigten Schnitte und entsprechend auch ihre Färbung (vgl. Abb. 29) sind nicht mit dem Vorhandensein einer Nekrose assoziiert.

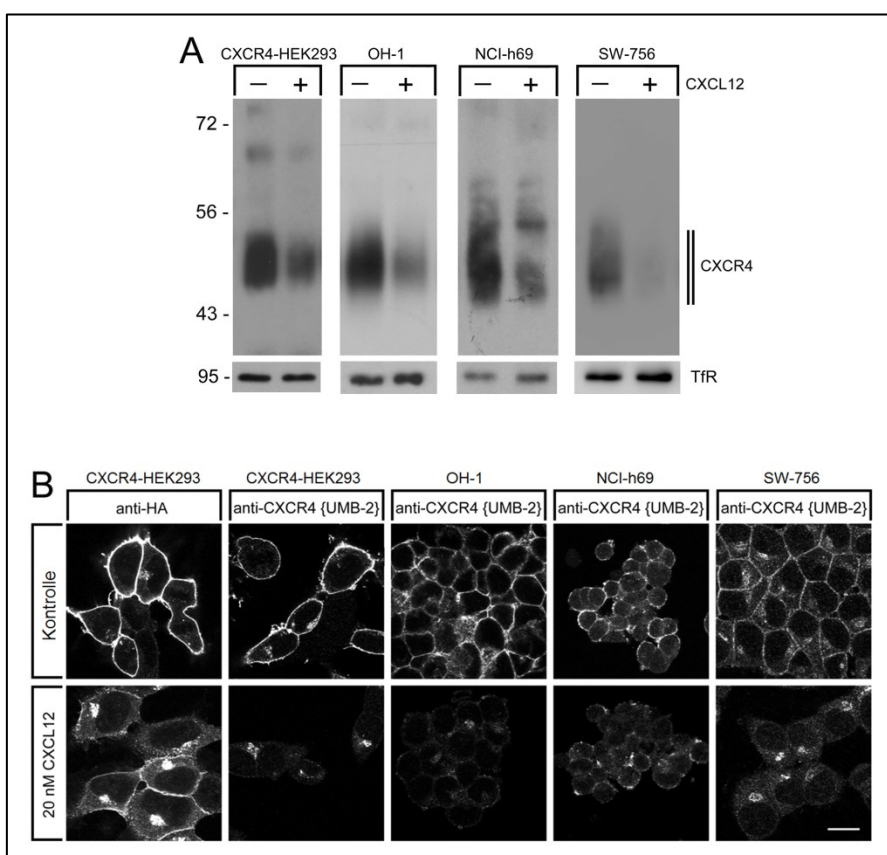


## 4.5) Expression des CXCR4 in humanen Krebszelllinien

### 4.5.1) Rezeptornachweis

Bei verschiedenen Krebszelllinien ließ sich eine endogene Expression des CXCR4 mit Hilfe des UMB-2 aufzeigen (vgl. Abb. 30).

Anhand der Western-Blot-Analyse konnte jeweils eine Abschwächung des mit dem UMB-2 erzeugten Signals bei den CXCL12-inkubierten Proben gegenüber der Kontrollprobe beobachtet werden. Die mit Hilfe des Antikörpers gegen den Transferrinrezeptor (TfR-AKs) erzeugten Signale zeigen, dass die aufgetragene Probenmenge jeweils vergleichbar ist (Abb. 30 A).



**Abb. 30:** Endogene Expression des CXCR4 in Krebszelllinien.

Mit Hilfe des UMB-2 bzw. HA-AK wurde der CXCR4 in der Western-Blot-Analyse (A) oder der Immunzytochemie (B) bei CXCR4-HEK293 und verschiedenen humanen Krebszelllinien nachgewiesen. Die Zellen wurden jeweils nicht oder mit CXCL12 (20 nM, 15 min) inkubiert, was die Internalisierung und Phosphorylierung des CXCR4 bewirkt.

OH-1- und NCI-h69-Zellen: SCLC-Zelllinien; SW-765: Zervixkarzinomzelllinie. TfR: Transferrin-Rezeptor, 95 kDa; CXCR4 ~ 47 kDa. Größenbalken: 20 µm

In der immunzytochemischen Darstellung der Zellen wird die membranständige Expression des Rezeptors deutlich. Das mit Hilfe des UMB-2 erzeugte Rezeptorsignal wird nach der CXCL12-Inkubation schwächer, der Antikörper bindet aufgrund seiner Phosphosensitivität nicht an den phosphorylierten Rezeptor, intrazelluläre Cluster las-

sen sich nur schwach oder gar nicht detektieren. Bei der Färbung des CXCR4 mit dem nicht-phosphosensitiven HA-AK sind intrazelluläre Cluster, und dementsprechend der nach Ligandenkontakt internalisierte Rezeptor, gut zu erkennen.

#### **4.5.2) Antagonisierung des CXCR4**

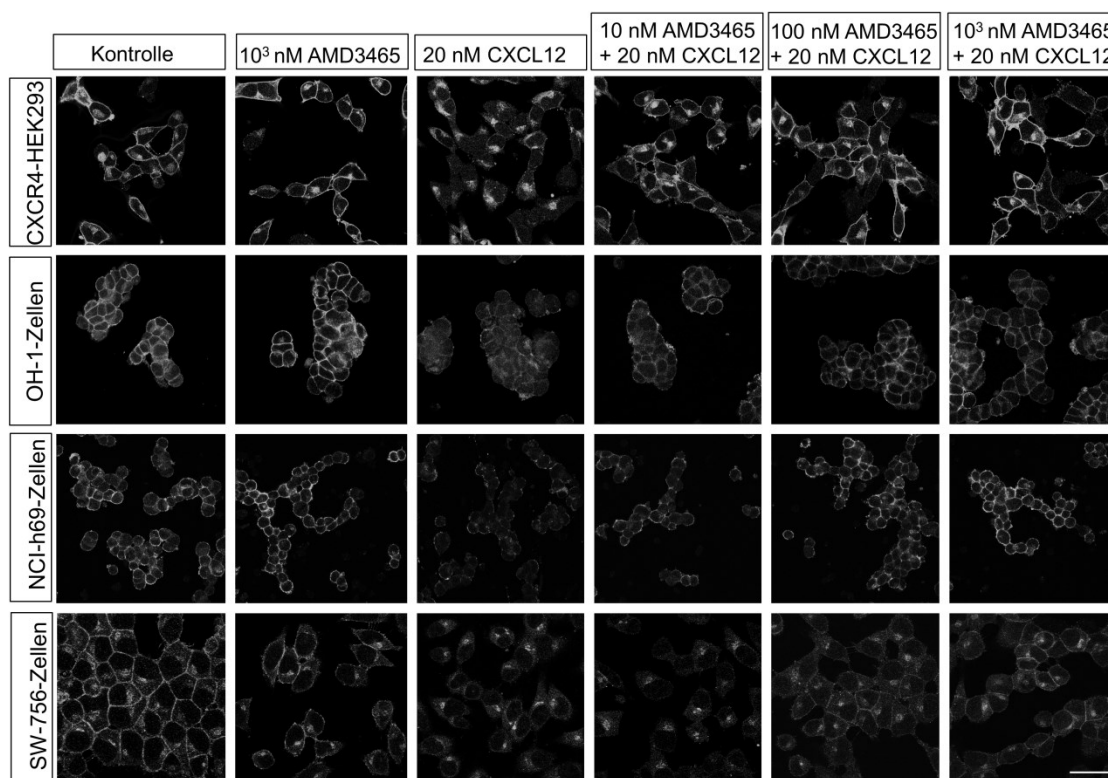
Die Antagonisierung des CXCR4 wurde an den eben beschriebenen Zelllinien (vgl. Kap. 4.5.1) mit Hilfe dreier verschiedener Substanzen, AMD3465, FC131 und <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2 (vgl. Kap. 3.4), untersucht. Die Zellen wurden, wie in Kapitel 3.7 beschrieben, mit verschiedenen Konzentrationen des jeweiligen Antagonisten und/oder 20 nM CXCL12 behandelt. Durch die Inkubation mit dem Antagonisten allein sollte gezeigt werden, dass die genutzten Substanzen nicht als Agonisten wirken.

Wie in den nachfolgenden Abbildungen 31-33 deutlich wird, verhalten sich die drei untersuchten Liganden antagonistisch, d.h. sie verhindern die Phosphorylierung des Rezeptors durch CXCL12.

Das mit Hilfe des UMB-2 und einem Alexa-488-gekoppelten Sekundär-AK erzeugte Fluoreszenzsignal unterscheidet sich nicht zwischen den unbehandelten Kontrollzellen und den nur mit Antagonist inkubierten Zellen. Der Rezeptor erscheint bei allen Zelllinien jeweils membranständig, es findet keine Rezeptorphosphorylierung und Internalisierung statt.

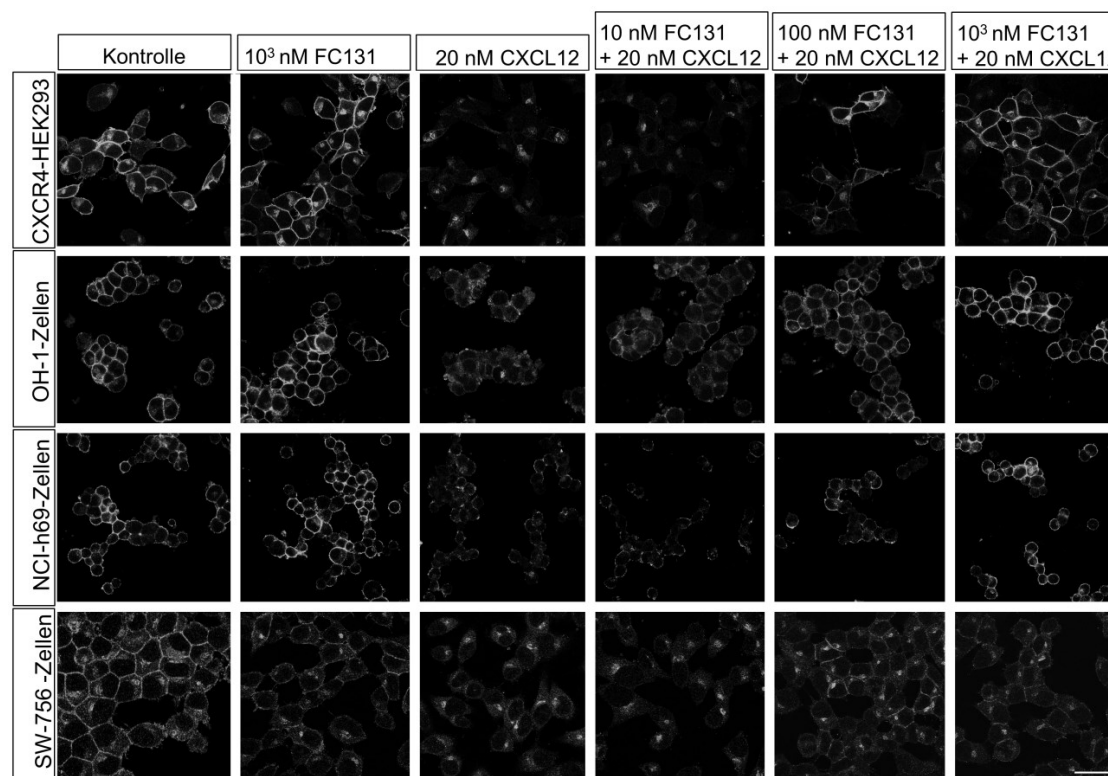
Die Inkubation der Zellen mit dem Agonisten CXCL12 bewirkt eine Phosphorylierung des CXCR4, so dass dieser aufgrund der phosphosensitiven Bindungseigenschaften des UMB-2 nicht oder nur noch sehr schwach an der Membran detektiert werden kann. Da durch die Ligandenbindung eine Internalisierung des CXCR4 bewirkt wird, kann der Rezeptor, wenn auch nur schwach, außerdem in intrazellulären Clustern detektiert werden.

Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit CXCL12 und dem jeweiligen Antagonisten in aufsteigender Konzentration gibt einen Hinweis auf die antagonistische Potenz der Substanzen.



**Abb. 31:** Antagonisierung der CXCL12-Wirkung am CXCR4 bei verschiedenen Zelllinien durch AMD3465.

Immunzytochemie. Primär-AK: UMB-2, Sekundär-AK: Alexa-Fluor-488. Originalvergrößerung: 10x63. Größenbalken: 40  $\mu$ m.



**Abb. 32:** Antagonisierung der Wirkung von CXCL12 am CXCR4 bei verschiedenen Zelllinien durch FC131.

Immunzytochemie. Primär-AK: UMB-2, Sekundär-AK: Alexa-Fluor-488. Originalvergrößerung: 10x63. Größenbalken: 40  $\mu$ m.

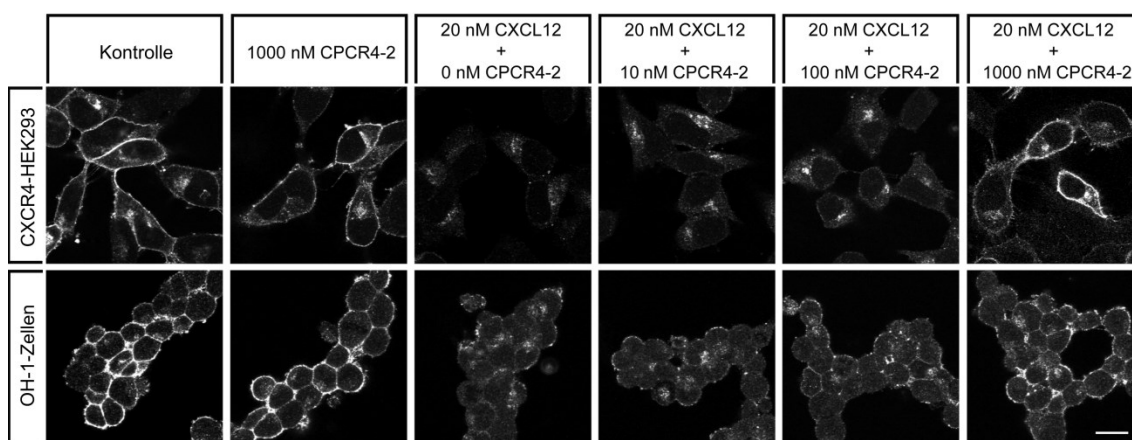
Mit zunehmender Antagonistenkonzentration wird das CXCL12 zunehmend daran gehindert, an den Rezeptor zu binden und diesen zu aktivieren, respektive zu phosphorylieren, und eine Internalisierung zu bewirken. Dementsprechend wird das Fluoreszenzsignal intensiver und der CXCR4 ist an der Membran detektierbar.

Mit Ausnahme der SW-756-Zellen, bei denen das Signal der Zellen, die mit 20 nM CXCL12 und 1000 nM FC131 oder AMD3465 inkubiert wurden, schwächer als das der Kontrolle erscheint, ist bei allen Zelllinien in der eben genannten Konzentration ein ähnlich intensives Signal wie bei der Kontrolle detektierbar.

Hinsichtlich der Bildung intrazellulärer Cluster nach der Inkubation mit CXCL12 lassen sich zwischen den Zelllinien ebenfalls Unterschiede erkennen. Bei den CXCR4-HEK293- und den SW-756-Zellen ist der Rezeptor nach CXCL12-Kontakt intrazellulär sichtbar, bei den OH-1- und den NCI-h69-Zellen ist das nicht der Fall.

Betrachtet man die antagonistische Potenz der untersuchten Liganden, scheinen sich AMD3465 und FC131 aufgrund der vorliegenden Ergebnisse voneinander zu unterscheiden. Bereits bei einer eingesetzten Konzentration von 10 nM AMD3465 lässt sich der CXCR4 bei allen Zelllinien an der Membran detektieren, bei FC131 ist das erst bei 100 nM der Fall.

Die antagonistische Potenz von  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2 wurde nur an den CXCR4-HEK293- und OH-1-Zellen getestet. Die jeweils erhaltenen Färbungen unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Intensität, mit der der CXCR4 detektiert werden kann, nicht voneinander. Aus Abbildung 33 wird deutlich, dass bei 100 nM an eingesetzter Substanz der Rezeptor, ähnlich wie bei einer Inkubation der Zellen mit 10 nM  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2 plus CXCL12 oder nur mit CXCL12, noch immer stark phosphoryliert vorliegt. Bei einer Konzentration von 1000 nM ist die Membranständigkeit des Rezeptors jedoch deutlich erkennbar.



**Abb. 33:** Antagonisierung der CXCL12-Wirkung am CXCR4 bei CXCR4-HEK293- und OH-1-Zellen durch  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2 (CPCR4-2). Immunzytochemie. Primär-AK: UMB-2, Sekundär-AK: Alexa-Fluor-488. Originalvergrößerung: 10x63. Größenbalken: 20µm.



Da eine Antagonisierung des CXCR4 und dementsprechend die Bindung dieser Substanzen an den CXCR4 vor allem in der Diagnostik und in der Therapie CXCR4-exprimierender Tumore von Bedeutung sind, werden die in diesem Unterkapitel vorgestellten Ergebnisse im Kapitel 5.4), das sich mit der klinischen Nutzbarkeit des CXCR4 beschäftigt, diskutiert.

## 5) Diskussion

### 5.1) Eignung des UMB-2 zur Darstellung des CXCR4

Sowohl immunhistologisch als auch immunzytochemisch ließ sich der CXCR4 mit Hilfe des phosphosensitiven UMB-2 vorwiegend an der Zellmembran von Tumorzellen histologischer Präparate bzw. bei Krebszelllinien darstellen. Außerdem war es möglich, mit Hilfe des UMB-2 bei den verschiedenen Krebszelllinien in der Western-Blot-Analyse ein Rezeptorsignal zu detektieren (vgl. Kap. 4.2 und 4.5).

Mit der Dot-Blot-Analyse (vgl. Kap. 4.1, Abb. 8 C) ließ sich zum einen der Bereich des Epitops, an das der UMB-2 bindet, eingrenzen. Zum anderen konnten die phosphosensitiven Eigenschaften des AKs dargestellt werden. Der Vergleich der Signale von Peptid 1, das zur Generierung des UMB-2 genutzt wurde, und Peptid 4 lässt darauf schließen, dass das Epitop des UMB-2 im Bereich der AS 340-352 des humanen CXCR4 liegt. Außerdem findet keine Bindung des UMB-2 an die phosphorylierten Peptidsequenzen (Peptid 2 und 3) statt, was die Phosphosensitivität des AKs verdeutlicht. Diese wurde in einem weiteren Experiment dargestellt, in dem CXCR4-HEK293-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen an AMD3100 und zusätzlich 20 nM CXCL12 inkubiert wurden (vgl. Kap. 4.1, Abb. 8 B). Bei niedrigen Konzentrationen des Antagonisten kann das CXCL12 an den Rezeptor binden, was zu dessen Phosphorylierung führt und die Bindung des UMB-2 verhindert, so dass das detektierte Signal nur schwach ist. Bei einer hohen AMD3100-Konzentration wird das CXCL12 nahezu vollständig daran gehindert, an den Rezeptor zu binden; das ermittelte Signal ist ähnlich intensiv wie das der Kontrolle. Der anti-pS346/347-AK bindet ebenfalls an den CXCR4, aber nur wenn dieser phosphoryliert vorliegt, so dass das Signal mit zunehmender Konzentration des Antagonisten bei gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit 20 nM CXCL12 zunehmend schwächer wird. Die phosphospezifischen bzw. phosphosensitiven Eigenschaften der genannten AK konnten bereits von Mueller et al. (2013) am murinen CXCR4 dargestellt werden (Mueller et al. 2013).

Die Phosphosensitivität des UMB-2 wirft jedoch die Frage auf, inwieweit der AK geeignet ist, den CXCR4 in neoplastischem Gewebe bzw. in Krebszelllinien nachzuweisen, da in der Literatur eine mögliche Expression von CXCL12 durch den Tumor selbst beschrieben ist (Imai et al. 2010, Sun et al. 2014). Mit der  $\lambda$ -PP kann indirekt das Ausmaß der Phosphorylierung des CXCR4 im Gewebe dargestellt werden. Dazu wurde zunächst die Funktionalität der  $\lambda$ -PP bei CXCR4-HEK-293-Zellen mit einer Western-Blot-Analyse überprüft (vgl. Kap. 4.1, Abb. 8 D). Die Zellen wurden dafür mit CXCL12 stimuliert, wodurch sich eine Phosphorylierung des CXCR4 herbeiführen ließ. Die Probe wurde im Anschluss aliquotiert und ein Teil mit  $\lambda$ -PP inkubiert. Die dadurch aufgehobene Phosphorylierung des Rezeptors konnte später anhand der Bandenintensität beurteilt werden: bei der mit  $\lambda$ -PP

behandelten Probe ließ sich mit Hilfe des UMB-2 eine Bande detektieren, deren Intensität ähnlich der der Kontrollbande war. Die nicht mit  $\lambda$ -PP inkubierte Probe zeigte dagegen eine schwache Bande, denn der UMB-2 konnte aufgrund der CXCL12-induzierten Rezeptorphosphorylierung nur schwach binden. Dementsprechend eignet sich die  $\lambda$ -PP zur Dephosphorylierung des Rezeptors und ermöglicht folglich die Darstellung nahezu aller in einer Probe enthaltenen CXCR4-Rezeptoren durch den UMB-2. Dies konnte durch die mit dem HA-AK erzeugten Banden, durch die die Gesamtzeptormenge in der Probe dargestellt wird, bestätigt werden.

Die Behandlung eines Zytoblock-Schnittes, der aus mit CXCL12 inkubierten Zellen gewonnen wurde, mit  $\lambda$ -PP verdeutlicht, dass sich die durch CXCL12 induzierte Phosphorylierung des Rezeptors auch bei vormalig in Paraffin eingebetteten Proben hierdurch aufheben lässt (vgl. Kap. 4.1, Abb. 9 A-B, D). Der Rezeptor lässt sich teilweise noch an der Membran detektieren oder als intrazelluläre Cluster, die aufgrund der  $\lambda$ -PP-induzierten Dephosphorylierung jetzt sichtbar sind. Nach einem 30-minütigen CXCL12-Washout mit Medium ist der Rezeptor ähnlich intensiv wie bei den Kontrollzellen an der Membran nachweisbar, außerdem weisen die Zellen eine runde, kugelige Form wie die Kontrollzellen auf. Dieses Experiment verdeutlicht zum einen, dass die  $\lambda$ -PP auch in dieser Versuchsanordnung eine Dephosphorylierung des Rezeptors bewirkt und zum anderen gibt das Washout-Experiment einen Hinweis darauf, dass der Rezeptor in den Gewebeproben der Routinopathologie unphosphoryliert vorliegen könnte, da von einer Wartezeit zwischen Gewebeentnahme und der Verbringung in Formalin im klinischen Alltag ausgegangen werden kann. Das konnte bestätigt werden, indem in Paraffin eingebettete serielle Gewebeschnitte zweier Tumorentitäten vor der immunhistologischen Färbung mit  $\lambda$ -PP inkubiert wurden. Der Vergleich des Färbungsergebnisses mit dem des nicht mit  $\lambda$ -PP behandelten Präparates zeigte, dass sich bei beiden Schnitten die Intensität der Rezeptorfärbung nahezu nicht voneinander unterscheidet. Dementsprechend ließ sich mit diesem Experiment zeigen, dass der CXCR4 in immunhistologisch untersuchten Tumormustern größtenteils nicht phosphoryliert vorliegt. Folglich kann davon ausgegangen werden, dass die Rezeptorexpression, die auf diese Weise mit Hilfe des UMB-2 ermittelt wird, der Gesamt-Rezeptorexpression entspricht.

## 5.2) Expression des CXCR4 in humanen Krebszelllinien

Eine endogene Expression des CXCR4 konnte in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden. Für die SCLC-Zelllinien NCI-h69 und OH-1 konnte die CXCR4-Expression bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, jedoch nicht immunzytochemisch. So haben Gourni et al. (2011) den CXCR4 in durch OH-1-Zellen erzeugten Tumoren mit Hilfe des UMB-2 bereits immunhistochemisch nachge-

wiesen, wobei der Rezeptor in erster Linie an der Zellmembran detektiert werden konnte (Gourni et al. 2011). Daneben wurde der CXCR4 durch Hattermann et al. (2014) mit Hilfe der RT-PCR bei OH-1-Zellen nachgewiesen (Hattermann et al. 2014). Bei den NCI-h69-Zellen wurde die CXCR4-Rezeptorexpression mit Hilfe der Western-Blot-Analyse, der RT-PCR und der Flowcytometrie nachgewiesen (Pfeiffer et al. 2009, Burger et al. 2003).

Für die SW-756-Zelllinie (Zervixkarzinom) wurde bisher keine Studie publiziert, die eine Expression des CXCR4 beschreibt.

Der Nachweis der endogenen Rezeptorexpression in den in dieser Arbeit gezeigten Krebszelllinien ist ein Hinweis darauf, dass der CXCR4 in Neoplasien überdurchschnittlich stark exprimiert sein kann. Denn auch in anderen Studien konnte die Expression des CXCR4 in diversen Krebszelllinien gezeigt werden (Hattermann et al. 2014, Burger et al. 2003).

Den CXCR4 endogen exprimierende Zellen sind im Vergleich zu transfizierten Zellen weniger artifiziell, d.h. funktionelle Experimente, wie beispielsweise Proliferations- oder Migrationsassays entsprechen mehr der in-vivo-Situation, da die intrazellulären Signalproteine zumeist in physiologischer Weise vorliegen.

### **5.3) Expression des CXCR4 in Tumoren**

#### **5.3.1) CXCR4-Expression in verschiedenen Tumorentitäten**

Der CXCR4 wird innerhalb verschiedener Tumore in der Mehrzahl der Fälle membranständig exprimiert (vgl. Kap. 4.2, Abb. 10). Das konnte mit Hilfe des UMB-2 dargestellt werden. Beim Leiomyosarkom konnte der CXCR4 zusätzlich im Zytoplasma detektiert werden. In zahlreichen Studien wurde ebenfalls neben dem membranären ein zytoplasmatisches Vorkommen des CXCR4 innerhalb verschiedener Tumore immunhistochemisch ermittelt (vgl. Tab. 22). Die nukleäre Expression des in der Regel membrangebundenen Rezeptors ist kritisch zu bewerten und lässt sich vermutlich auf eine geringe Qualität des von den jeweiligen Arbeitsgruppen genutzten AKs zurückführen. So kann die Verwendung unspezifischer AK dazu führen, dass falsch positive Ergebnisse generiert werden, wie Fischer et al., die den UMB-2 erstmals immunhistochemisch charakterisiert haben, ebenfalls zeigen konnten (Fischer et al. 2008).

Die in der nachfolgenden Tabelle 22 aufgeführten Daten verdeutlichen die Relevanz und Präsenz des CXCR4 innerhalb der Tumorforschung.

**Tab. 22:** In der Literatur immunhistochemisch ermittelte Expression des CXCR4 in verschiedenen Tumorentitäten.

Fett gerahmte Felder markieren Tumore, die in der vorliegenden Arbeit mit dem UMB-2 immunhistochemisch untersucht wurden.

| Tumorart                                      | Rezeptorexpression            |                                    |
|---|-------------------------------|------------------------------------|
| Gastrointestinale Tumore                      |                               |                                    |
| Magenkarzinom                                 | Zytoplasma, Nukleus           | (Nikkhoo et al. 2014)              |
|   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Zheng et al. 2014)                |
|   | Zellmembran, Zytoplasma       | (He et al. 2013)                   |
|   | Zellmembran                   | (Fischer et al. 2008)              |
| Pankreaskarzinom                              | Zellmembran                   | (Mizukami et al. 2014)             |
|   | Zellmembran                   | (Fischer et al. 2008)              |
|   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Koshiba et al. 2000)              |
| Kolonkarzinom                                 | Zytoplasma                    | (Du et al. 2014)                   |
|   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Fischer et al. 2008)              |
| Kolorektalkarzinom                            | Zytoplasma, Zellmembran       | (Gao et al. 2014)                  |
| Rektalkarzinom                                | Zytoplasma, Nukleus           | (D'Alterio et al. 2014)            |
| Tumore lymphatischer Strukturen/ Zellen       |                               |                                    |
| Akute lymphatische Leukämie der B-Zellreihe   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Konoplev et al. 2011)             |
| Akute myeloische Leukämie                     | Positiv (keine genaue Angabe) | (Konoplev et al. 2013)             |
| B-Zell-Lymphom                                | Zellmembran, Zytoplasma       | (Shin et al. 2014)                 |
| Sarkome                                       |                               |                                    |
| Ewing-Sarkom                                  | Zellmembran, Zytoplasma       | (Berghuis et al. 2012)             |
| Osteosarkom                                   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Guo et al. 2014)                  |
| Rhabdomyosarkom                               | Zellmembran                   | (Miyoshi et al. 2014)              |
|   | Zytoplasma, Nukleus           | (Diomedi-Camassei et al. 2008)     |
| Verschiedene                                  | Positiv (keine genaue Angabe) | (Oda et al. 2009)                  |
| Tumore von Geschlechtsorganen                 |                               |                                    |
| Mammakarzinom                                 | Zytoplasma                    | (Cabioglu et al. 2007)             |
|   | Zellmembran, Zytoplasma       | (Sun et al. 2014)                  |
|   | Zellmembran                   | (Fischer et al. 2008)              |
| Ovarialkarzinom                               | Nukleus                       | (Poppo et al. 2012)                |
|   | Zytoplasma                    | (Sekiya et al. 2012)               |
|   | Zellmembran                   | (Fischer et al., 2008)             |
| Endometriumkarzinom                           | Zellmembran, Zytoplasma       | (Walentowicz-Sadlecka et al. 2014) |
| Zervixkarzinom                                | Zellmembran                   | (Huang et al. 2013)                |
|   | Zellmembran                   | (Fischer et al., 2008)             |
| Prostatakarzinom                              | Zellmembran, Zytoplasma       | (Lu et al. 2013)                   |
| Tumore der Lunge                              |                               |                                    |
| Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC) | Zellmembran, Zytoplasma       | (Wang et al. 2014b)                |
|   | Zytoplasma, Nukleus           | (Spano et al. 2004)                |
| SCLC  | Zellmembran                   | (Li et al. 2014)                   |
| Tumore der Haut                               |                               |                                    |
| Merkelzell-Karzinom                           | Zellmembran                   | (Wheat et al. 2014)                |
| Melanom                                       | Zytoplasma                    | (Toyozawa et al. 2012)             |
| Basaliom                                      | Zytoplasma, Zellmembran       | (Xu et al. 2013a)                  |

|                                 |                     |                       |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------|
| Tumore der Harnorgane           |                     |                       |
| Nierenzellkarzinom              | Zellmembran         | (Wang et al. 2012)    |
| Blasenkarzinom                  | Zytoplasma, Nukleus | (Retz et al. 2005)    |
| Tumore der Nebenniere           |                     |                       |
| Phäochromozytom                 | Zellmembran         | (Fischer et al. 2008) |
| Tumore des Zentralnervensystems |                     |                       |
| Glioblastom                     | Zellmembran         | (Fischer et al. 2008) |

Die gezeigten Daten sprechen für ein starkes und scheinbar ubiquitäres Vorkommen des CXCR4 innerhalb verschiedener Neoplasien. Auch für die Mehrzahl der in der vorliegenden Arbeit gezeigten Tumore finden sich Studien, die eine Expression des CXCR4 beschreiben (fett schwarz gerahmte Felder, Tab. 22).

Für einen Teil der Tumore ist die Expression des CXCR4 bislang noch nicht dokumentiert. Das könnte dem relativ seltenen Auftreten dieser Neoplasien, wie es beispielsweise bei Sarkomen und dem Merkelzell-Karzinom der Fall ist, geschuldet sein (Jain et al. 2010, Ramahi et al. 2013). Oda et al. (2009) haben eine Vielzahl von Weichteilsarkomen, die sie auf histologischen Merkmalen basierend gruppiert haben, untersucht. Leiomyosarkome wurden der Gruppe nicht-rundzelliger Tumore zugeordnet, wie beispielsweise auch Angiosarkome oder Liposarkome. Ihre Ergebnisse zur Rezeptorexpression geben sie jeweils für die gesamte Gruppe an, wobei die Stärke der Immunfärbung bewertet wurde. In der Gruppe der nicht-rundzelligen Tumore wurden, verglichen mit den anderen Gruppen, die intensivsten Immunfärbungen erzielt (Oda et al. 2009). Für die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Lungentumoren konnten lediglich für das SCLC Studien gefunden werden, die die Expression des CXCR4 beschreiben. Ursachen hierfür sind vermutlich das vergleichsweise aggressive Verhalten dieser Tumorentität und die geringen Behandlungsmöglichkeiten, so dass ein hohes Bestreben besteht, neue therapeutische Ansatzpunkte zu finden.

### 5.3.2) CXCR4-Expression in BP-NETs

Zur Expression des CXCR4 in BP-NETs existieren nur wenige Studien. Für TC und AC konnten keine Untersuchungen, in denen das Vorkommen des CXCR4 bereits analysiert wurde, gefunden werden, so dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht vergleichend betrachtet werden können. Beim SCLC konnte hingegen sowohl in Tumorgewebe als auch bei Krebszelllinien die CXCR4-Expression nachgewiesen werden (Burger et al. 2003, Hattermann et al. 2014, Li et al. 2014).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des CXCR4 sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene untersucht und erstmalig mit den Überlebensdaten der Patienten korre-

liert. Der Umfang der Studie mit knapp 100 Patienten ist groß genug, um statistische Aussagen zu ermöglichen.

Mit der Generierung verschiedener Variablen für das Überleben (vgl. Kap. 3.14) sollte einer Verzerrung der Lagemaße vorgebeugt werden. Die Daten aus Tabelle 11 verdeutlichen, dass mit Hilfe der Variablen „3- bzw. 5-Jahres-Überleben“ im Gegensatz zu der des „Gesamt-Überlebens“ zwischen den Tumorentitäten Abstufungen hinsichtlich des mittleren Überlebens deutlich wiedergegeben werden können. Die jeweils nur geringfügig kleinere n-Zahl der neu generierten Überlebens-Variablen spricht dafür, die Variablen für die statistische Auswertung zu nutzen.

Die Korrelation der verschiedenen Überlebensvariablen untereinander (vgl. Tab. 15) zeigte, dass das 5-Jahres-Überleben stärker als das 3-Jahres-Überleben mit dem Gesamt-Überleben korreliert. Weiterhin konnte jeweils die stärkste Korrelation zwischen den verschiedenen Überlebensvariablen mit dem IRS bzw. den anderen Auswertungs-Scores bei der Variable 5-Jahres-Überleben festgestellt werden. Dementsprechend ist die Variable 5-Jahres-Überleben in der vorliegenden Stichprobe für die Darstellung von Zusammenhängen zwischen der Überlebenszeit und anderen Variablen am besten geeignet.

Das Durchschnittsalter der Patientenstichprobe lag bei den drei untersuchten Tumorentitäten jeweils im Bereich der sechsten Lebensdekade. Dieses Alter bei Erstdiagnose wird auch in anderen Studien genannt (Cardillo et al. 2004, Filosso et al. 2002). TC und AC traten zusätzlich auch bei jüngeren Patienten auf, wohingegen SCLC nur bei Patienten im fortgeschrittenen Alter diagnostiziert worden sind.

Das Auftreten von SCLC scheint mit dem männlichen Geschlecht assoziiert zu sein, bei dem das Rauchen von Tabak immer noch stärker verbreitet ist als bei Frauen. Im Gegensatz zum SCLC konnte bei pulmonalen Karzinoiden bisher kein sicherer Zusammenhang zum Rauchen hergestellt werden (Iglesias et al. 2004, Hassan et al. 2008, Sayeg et al. 2014, Kalemkerian et al. 2013, Madrid-Carbajal et al. 2013).

In der vorliegenden Untersuchung umfasste die TC-Gruppe im Gegensatz zu den beiden anderen untersuchten Tumorentitäten die höchste Anzahl an weiblichen Patienten. Vermutlich ist dies jedoch ein Spezifikum der untersuchten Patientenstichprobe, denn laut Literatur ist die Inzidenz für TC bei Frauen und Männern gleich (Filosso et al. 2002, Soga und Yakuwa 1999).

Die anhand der immunhistochemischen Färbung ermittelten IRS-Werte zeigen, dass sich AC und TC hinsichtlich der Ausprägung des IRS signifikant voneinander unterscheiden (Mann-Whitney-U-Test,  $p=0,028$ ). Beim TC wird der CXCR4 am schwächsten exprimiert. AC und TC unterscheiden sich mit je  $p<0,001$  (Mann-Whitney-U-Test) signifikant vom SCLC. Das verdeutlicht die immunhistochemisch ermittelte starke Expression des CXCR4 beim SCLC. Diese stufenweise stärkere CXCR4-Expression zwischen den Tumorentitäten

ten (TC < AC < SCLC) könnte mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen, früherer Rezidivbildung oder erhöhter Aggressivität der Tumore in Verbindung gebracht werden (He et al. 2013, Gao et al. 2014, Li et al. 2014, Chen et al. 2011, Sayeg et al. 2014). Außerdem scheint die Lymphknotenbeteiligung ein prognostisches Kriterium für die Rezidiventstehung bei Tumoren zu sein (Okoye et al. 2014). Für AC und TC wurde bereits ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Metastasen und der Rezidiventstehung beschrieben (Ferolla et al. 2009, Okoye et al. 2014).

Die drei nach Tumorentität unterteilten geschlechtsspezifischen Überlebenskurven sind dahingehend überraschend, dass Frauen beim AC gegenüber Männern ein deutlich verbessertes Überleben aufweisen, obwohl der Mittelwert des erhobenen IRS bei ihnen größer ist (vgl. Kap. 4.3.3.4, Abb. 18 und 19). Ein signifikanter Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen Männern und Frauen wird in anderen Studien allerdings nicht beschrieben (Cardillo et al. 2004, Steuer et al. 2015). Folglich handelt es sich hier vermutlich um ein Spezifikum der vorliegenden Stichprobe. Die Diskrepanz zwischen dem mittleren IRS-Wert und dem Überleben in Hinblick auf das Geschlecht ist ebenfalls ein sehr unerwartetes Ergebnis. Das spricht dafür, dass andere Variablen, die in der vorliegenden Studie nicht betrachtet worden sind, ebenfalls einen Einfluss auf das Überleben haben.

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten ebenfalls eine gestaffelte Ausprägung der mRNA-Level bei den verschiedenen Tumorentitäten (TC < AC < SCLC), wie auch beim IRS. Das spricht zunächst dafür, dass die qRT-PCR zum Nachweis der Rezeptorexpression geeignet ist. TC und AC unterscheiden sich jeweils signifikant vom SCLC hinsichtlich des ermittelten mRNA-Levels, unabhängig davon, ob die Messwerte in Quartile gruppiert wurden oder nicht (vgl. Tab. 13). TC und AC sind hinsichtlich des mRNA-Levels nicht signifikant voneinander verschieden. Obwohl der Median beim AC etwas höher als beim TC ist, ist beim TC die Spannweite deutlich größer als beim AC. Außerdem sind in allen drei Tumorentitäten Proben enthalten, die hinsichtlich des mRNA-Levels in Quartil 3 eingruppiert werden müssen (vgl. Abb.15). Dies ist im Gegensatz dazu in Bezug auf den IRS beim TC nicht der Fall. Hier sind alle ermittelten Werte niedrig. Das verdeutlicht, dass wenn der ermittelte IRS für die Tumorentität im Allgemeinen niedrig ist, kann im Einzelfall dennoch ein hohes mRNA-Level erreicht werden. Das deutet darauf hin, dass offensichtlich nicht aus jeder mRNA ein Protein entstehen muss. Die Korrelation zwischen IRS- und qRT-PCR-Werten ( $r=0,691$ ,  $p<0,001$ ) spricht dennoch für einen relativ starken Zusammenhang zwischen mRNA- und Proteinlevel. Eine Vergleichbarkeit von immunhistochemisch ermittelter Rezeptorexpression und PCR-Daten konnte bereits für andere Rezeptoren gezeigt werden (de Cremoux et al. 1999, Kaemmerer et al. 2015).



Eine Diskrepanz zwischen der Ausprägung des IRS und des mRNA-Levels wurde jedoch beim TC und beim AC deutlich, da, anders als beim SCLC, bei diesen Tumorentitäten die Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Level nicht signifikant war. Das könnte zum einen damit erklärt werden, dass beim TC und AC im Vergleich zum SCLC weniger mRNA vorliegt, die translatiert werden kann. Zum anderen könnten sich die translatorischen Regulationsmechanismen zwischen den Tumorentitäten unterscheiden, so dass hierin die Ursache für die Differenz zwischen mRNA und Protein liegen könnte.

Die im Verhältnis zu den IRS-Werten ebenfalls hohen mRNA-Level beim SCLC und die signifikante moderate Korrelation ( $r=0,51$ ,  $p=0,037$ ) beider sprechen für das Potential der PCR als ergänzendes diagnostisches Mittel beim SCLC.

Im Hinblick auf das mittlere Überleben der Patienten ist es sinnvoll, Lagemaße für einen definierten Zeitraum anzugeben (vgl. Tab. 11), da andernfalls Überlebensunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nicht erfasst werden können. Die in Tabelle 11 aufgeführten Lagemaße verdeutlichen, dass das 5-Jahres-Überleben zwischen TC, AC und SCLC stufenweise abnimmt, wobei der Unterschied zwischen TC bzw. AC am stärksten ausgeprägt ist. Das entspricht den Erwartungen, da das TC allgemein als weniger aggressiv gilt und laut Literatur ein wesentlich längeres 5-Jahres-Überleben aufweist als die beiden anderen Tumorentitäten (Gustafsson et al. 2008). Die errechneten Kaplan-Meier-Überlebenskurven verdeutlichen die Unterschiede im kumulativen Gesamt-Überleben zwischen den drei Tumorentitäten. Das Überleben der Patienten mit SCLC ist signifikant kürzer als das der beiden anderen in dieser Arbeit untersuchten BP-NETs (Kruskall-Wallis-Test:  $p<0,001$ ). Gegenüber dem TC ist auch beim AC das kumulative Überleben geringer. In der Literatur variieren die Angaben zum Überleben, wobei dies von der durchgeführten Therapie abhängig ist. Häufig wird das mittlere Überleben der SCLC-Patienten kürzer angegeben, als in der vorliegenden Studie ermittelt (Liu et al. 2014, Fiegl et al. 2014, Ma et al. 2014).

Zwischen der CXCR4-Expression (IRS) und dem Überleben konnte eine signifikante inverse Korrelation gefunden werden (5-Jahres-Überleben:  $r=-0,536$ ,  $p<0,001$ ,  $n=60$ ). Die Kaplan-Meier-Überlebenskurve für die gruppierten IRS-Werte (vgl. Kap. 4.3.3, Abb. 21) verdeutlicht, dass bei einer mäßig starken und starken Expression des IRS das kumulative Überleben im Vergleich zu keiner oder einer nur schwachen CXCR4-Expression deutlich kürzer ist. Der scheinbar widersprüchliche Kurvenverlauf der Gruppen mit negativer und schwach positiver CXCR4-Expression lässt sich auf die unterschiedliche Fallzahl in beiden Gruppen zurückführen und würde sich bei gleicher Gruppenstärke und einer größeren Stichprobe vermutlich angleichen.

Auch zwischen mRNA-Level und Überleben konnte eine signifikante inverse Korrelation gefunden werden (5-Jahres-Überleben:  $r=-0,451$ ,  $p=0,001$ ,  $n=50$ ). Die Kaplan-Meier-

Überlebenskurven (vgl. Kap. 4.3.3, Abb. 22) verdeutlichen, dass bei mäßigen und hohen mRNA-Werten das kumulative Überleben niedriger ist. Alle aufgeführten Gruppen (Quartile des mRNA-Levels) unterscheiden sich signifikant voneinander (Log-Rank-Test:  $p < 0,001$ ). Dementsprechend könnte die Analyse des CXCR4-mRNA-Levels neben dem ermittelten IRS als prognostisches Werkzeug genutzt werden.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass beim SCLC die Expression des CXCR4 besonders intensiv ist, was sowohl immunhistochemisch als auch mit Hilfe der PCR-Analyse gezeigt werden konnte. Hohe Werte bei beiden Analysemethoden korrelieren mit einem schlechteren Überleben der Patienten. Ein Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und dem dadurch verschlechterten Überleben wurde auch in anderen Studien hergestellt (He et al. 2013, Al Zobair et al. 2013, Lv et al. 2014). Hartmann et al. beschreiben ebenfalls eine hohe Expression des CXCR4 beim SCLC, was sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit deckt (Hartmann et al. 2004).

### **5.3.3) Membranäre und zytoplasmatische Expression**

Neben der Expression des CXCR4 an der Zellmembran ist auch ein zytoplasmatisches Vorkommen des Rezeptors möglich, so wie beim Leiomyosarkom in der vorliegenden Arbeit (vgl. Kap. 4.2). Die für dieses Präparat durchgeführte Peptidneutralisation verdeutlichte jedoch die Spezifität des UMB-2: nach Inkubation des AKs mit dem zur Immunisierung genutzten Peptid konnte der AK nicht mehr an den Rezeptor binden, da er zuvor bereits spezifisch an das Peptid gebunden hatte. Es konnte somit keine immunhistochemische Färbung erzeugt werden. Gourni et al. (2011) konnten mit Hilfe einer Peptidneutralisation bei durch Implantation von OH-1-Zellen in immundefizienten Mäusen erzeugten Tumoren ebenfalls die Spezifität des UMB-2 zeigen (Gourni et al. 2011).

Auch in anderen Studien wird ein zytoplasmatisches Vorkommen des CXCR4 beschrieben (vgl. Tab. 22), das häufig neben dem membranständigen Auftreten des Rezeptors festgestellt wird. Das spricht dafür, dass der CXCR4 auch im Zytoplasma lokalisiert sein kann, wofür verschiedene Ursachen in Fragen kommen: (1) die Zellen werden durch auto- oder parakrin sezerniertes CXCL12 stimuliert, was zur Internalisierung des CXCR4 führt oder (2) andere Zytokine modifizieren die Rezeptorexpression.

Gegen die Internalisierung nach Ligandenkontakt spricht einerseits die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung des Rezeptors, denn wie beispielsweise in der Abbildung 30 (vgl. Kap. 4.5) dargestellt, tritt der CXCR4 nach Inkubation mit CXCL12 in intrazellulären Clustern auf. Andererseits könnte ein Großteil der Rezeptoren, aufgrund permanenter CXCL12-Stimulation, internalisiert vorliegen. Zum Zeitpunkt der Fixierung mit Formalin könnten die Rezeptoren bereits dephosphoryliert gewesen sein. Kim et al. (2008) stellten bei verschiedenen Leberkarzinomzelllinien ebenfalls unerwartet ein gleichmäßig, intrazel-

luläres Vorkommen des eigentlich membranständigen CXCR4 fest. Gleichwohl konnten sie zeigen, dass das CXCL12 dennoch an den CXCR4 bindet, indem sie die Phosphorylierung intrazellulärer Signalproteine nachweisen konnten. Die Autoren gehen dementsprechend davon aus, dass ein kleiner Teil der CXCR4-Rezeptoren trotzdem an der Membran lokalisiert ist (Kim et al. 2008). Diese wenigen Rezeptoren könnten dennoch, geht man von einem nicht linearen Verhältnis von Effizienz des Effektors und der Anzahl der Bindungen des Liganden an den Rezeptor aus, einem Phänomen das als „Rezeptor-reserve“ umschrieben wird, die Rezeptorfunktionen in physiologisch normalem Maßstab ausüben (Marunaka et al. 2005). Im Widerspruch zu dieser Annahme steht, dass Kim et al. (2008) bei durch CXCL12 stimulierten Zellen keine Migration oder Proliferation dieser beobachten konnten, was sie versuchten durch die Anwesenheit des CXCR7 zu erklären, dessen Expression sie allerdings nicht erhoben hatten (Kim et al. 2008). Eine Sekretion von CXCL12 durch den Tumor selbst wurde für verschiedene Sarkome wie das Osteosarkom und das Ewing-Sarkom immunhistochemisch bereits gezeigt (Baumhoer et al. 2012, Berghuis et al. 2012).

Neben dem CXCL12 könnten auch andere Zytokine das zelluläre Vorkommen des CXCR4 bestimmen. So konnten Brühl et al. (2003) zeigen, dass die Oberflächenexpression des CXCR4 auf Neutrophilen unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  abnimmt und der Rezeptor gleichmäßig im zytoplasmatischen Raum detektierbar ist (Bruhl et al. 2003). Obwohl der UMB-2 die Rezeptorexpression gut abzubilden scheint, ließe sich das zytoplasmatische Ergebnis der Färbung durch ein zusätzliches, intrazellulär gelegenes Epitop, das durch den UMB-2 erkannt wird, erklären. Dieses Antigen muss nicht zwangsläufig in der Western-Blot-Analyse sichtbar werden, denn die Proben werden bei dieser Methode über WGA-Beads, die Zuckerreste binden, aufgereinigt. Da nicht jedes Protein glykosyliert vorliegt, ist es möglich, dass ein potentielles zweites Epitop bei dieser Methode nicht sichtbar wird.

#### **5.3.4) Expressionsmuster**

Bei der immunhistochemischen Auswertung der neoplastischen Gewebeschnitte konnten verschiedene Expressionsmuster beobachtet werden (vgl. Kap. 4.4).

Bei den einzelnen, stark den CXCR4 exprimierenden Zellansammlungen, die bei allen drei untersuchten Tumorentitäten der BP-NETs gefunden werden konnten, könnte es sich um Krebsstammzellen (CSCs) handeln. Das sind Zellen, die aufgrund von Mutationen aus Stammzellen, Progenitorzellen oder ausdifferenzierten Zellen hervorgehen können (Welte et al. 2010). Die therapeutische Resistenz vieler Tumore bzw. das Auftreten von Rezidiven wird mit CSCs in Verbindung gebracht (Islam et al. 2015). Nach Clevers (2011) könnte sich in Abhängigkeit von der Anzahl onkogener Mutationen theoretisch der gesamte

Tumor aus CSCs zusammensetzten (Clevers 2011). Dementsprechend ist es unklar, ob es sich bei den durch den UMB-2 gefärbten Zellen wirklich um CSCs handelt. Immunhistochemische Färbungen, die mit verschiedenen CSC-Markern, wie CD133, CD44 oder Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH1) bei Bronchialkarzinomen durchgeführt wurden, zeigen je nach angefärbtem Markerprotein häufig eine flächige Färbung von Zellen, zum Teil die Färbung kleiner Zellgruppen oder einzelner weniger Zellen (Sterlacci et al. 2014, Okudela et al. 2012). Die Expression des CXCR4 wurde in diesen Arbeiten jedoch nicht untersucht. Dennoch erinnert das Muster der Färbungen an die in der vorliegenden Arbeit erzeugten Muster. Eine Ko-Expression von Stammzellmarkern und dem CXCR4 wurde bisher nur in wenigen Studien beschrieben (Mizukami et al. 2014, Schneider et al. 2012). Mizukami et al. (2014) gelang die immunhistochemische Darstellung des CXCR4 und verschiedenen Stammzellmarkern (CD133, CD44, CD24, ALDH1) beim Adenokarzinom des Pankreas. Sie konnten zeigen, dass die Expression der Marker untereinander korrelierte. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression des CXCR4 und einem der Stammzellmarker konnte jedoch nicht hergestellt werden. Allerdings konnte u.a. gezeigt werden, dass sich die verstärkte Expression von CD133 negativ auf die Überlebensrate auswirkt (Mizukami et al. 2014).

Dennoch ist es vor diesem Hintergrund sinnvoll, die Expression des CXCR4 mit der von Stammzellmarkern in Verbindung zu bringen und durch Immunfärbungen, beispielsweise gegen CD133 oder CD44 zu bestätigen. Dadurch ließen sich neue Erkenntnisse hinsichtlich der Expression des CXCR4 auf Stammzellen gewinnen, die diagnostisch und therapeutisch genutzt werden könnten.

Wie einleitend dargestellt, wird ein Zusammenhang zwischen der Expression des CXCR4 und hypoxischen Bedingungen innerhalb des Tumors diskutiert. Einer Tumornekrose gehen in der Regel Mangelbedingungen, u.a. Hypoxie, voraus. Auf Abbildung 28 lässt sich bei den gezeigten nekrotischen Zellen, die noch nicht vollständig abgebaut sind, sehr gut eine membranständige Färbung erkennen, die für eine hohe Expression des CXCR4 innerhalb dieses Areals spricht. Darüber hinaus zeigen die angrenzenden Zellen eine sehr intensive CXCR4-Expression. Das spricht für eine erhöhtes Vorkommen des CXCR4 unter Mangelbedingungen. In zahlreichen Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen hypoxischen Bedingungen und der dadurch verstärkten Expression des CXCR4 bereits gezeigt werden (Guan et al. 2015, Guo et al. 2014, Munoz-Guerra et al. 2009, Su et al. 2014, Zagzag et al. 2006, Kim et al. 2008). Eine Immunfärbung der Tumorpräparate gegen HIF-1 $\alpha$  wäre dementsprechend aufschlussreich. Außerdem könnte mit Hilfe von Zellexperimenten, indem die Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt werden, überprüft werden, ob der CXCR4 unter Hypoxie stärker exprimiert wird. Der Nachweis von HIF-1 $\alpha$  würde, neben der Stärke der Rezeptorexpression, hier ebenfalls aufschlussreich sein.

Es konnte bei einer Vielzahl der untersuchten Präparate ein graduell verschiedenes Auftreten des CXCR4 innerhalb einer Tumorprobe beobachtet werden. Diese graduelle Färbung lässt sich jedoch nicht mit der Phosphosensitivität des UMB-2 und entsprechend einer Rezeptorphosphorylierung begründen, da die Experimente mit der  $\lambda$ -PP eindeutig gezeigt haben, dass der Großteil der Rezeptoren beim Einbringen der operativ entfernten Tumorprobe in Formalin bereits unphosphoryliert vorliegt (vgl. Abb. 9). Dementsprechend scheint die Rezeptorexpression innerhalb des Präparates unterschiedlich stark zu sein. Diese inhomogene Färbung könnte sich einerseits auf eine stellenweise erhöhte Rezeptorexpression oder andererseits auf einen partiellen Rezeptorabbau zurückführen lassen. HIF-1 $\alpha$  gilt als Transkriptionsfaktor, der die Expression des CXCR4 erhöht (Guan et al. 2015, Guo et al. 2014, Munoz-Guerra et al. 2009, Su et al. 2014, Zagzag et al. 2006). Die stellenweise verstärkte CXCR4-Expression könnte folglich mit hypoxischen Bedingungen in diesen Bereichen erklärt werden, müsste aber durch eine Färbung gegen HIF-1 $\alpha$  bestätigt werden.

Vom Tumor selbst produziertes CXCL12 und die dadurch induzierte Migration der Zellen könnte dieses spezifische Färbemuster ebenfalls erklären. Yoshitake et al. stellten beispielsweise im Bereich der Wachstumsfront von Kolorektalkarzinomen einen vergleichsweise erhöhten CXCL12-Spiegel fest (Yoshitake et al. 2008).

## **5.4) Klinische Nutzbarkeit des CXCR4**

### **5.4.1) Antagonisten und Antikörper**

Die vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen das Potential des CXCR4 als Zielstruktur für die Diagnose und die Therapie, wobei hierfür spezifisch bindende Antagonisten oder Antikörper essentiell sind. Mit der Antagonisierung von CXCL12 könnte die CXCR4-CXCL12-Achse ebenfalls unterbrochen werden, was sich therapeutisch nutzen ließe.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Antagonisierung des CXCR4 durch drei Liganden, AMD3465, FC131 und  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2, immunzytochemisch bei verschiedenen Zelllinien durch die Unterbindung der CXCL12-induzierten Phosphorylierung nach Antagonisteninkubation der Zellen gezeigt.

Für alle drei Substanzen ließ sich erwartungsgemäß eine agonistische Wirkung ausschließen (Thiele et al. 2014, Gourni et al. 2011, Otte et al. 2014, Rosenkilde et al. 2007, Bodart et al. 2009). Der Agonismus des natürlichen Liganden CXCL12 konnte dagegen bestätigt werden (Mueller et al. 2013).

Die Zellen wurden zunächst mit dem jeweiligen Antagonisten inkubiert, was zur Besetzung des CXCR4 führte, so dass das CXCL12 je nach eingesetzter Antagonistenkonzentration weniger oder gar nicht mehr an den Rezeptor binden konnte. Die Aktivierung und folglich Phosphorylierung des Rezeptors wurde auf diese Weise unterbunden, was mit

Hilfe des phosphosensitiven AKs UMB-2 dargestellt wurde. Diese Experimente verdeutlichen, dass die exemplarisch gewählten Antagonisten und Zelllinien geeignet sind, den Rezeptor und die Bindungseigenschaften der Liganden am endogenen System zu untersuchen; darüber hinaus können zelllinienspezifische Mutationen erkannt und weiter erforscht werden.

Das AMD3465 wies im Vergleich der drei untersuchten Antagonisten in der Immunzytochemie die höchste Potenz auf, <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2 die geringste.

Die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit AMD3465 und CXCL12 zeigte bereits bei einer Konzentration von 10 nM, dass sich ein Teil der Rezeptoren bei den SCLC-Zelllinien und den CXCR4-HEK293-Zellen an der Membran detektieren lässt. Bei den SW-756-Zellen war das nicht der Fall. Auch bei 100 nM bzw. 1000 nM AMD3465 erschien der Rezeptor bei dieser Zelllinie nicht annähernd so intensiv an der Membran wie es bei den unstimulierten SW-756-Zellen der Fall war. Bei den anderen Zelllinien konnte der Rezeptor bei einer eingesetzten Konzentration von 100 nM AMD3465 nahezu vollständig an der Membran detektiert werden. Das spricht dafür, dass die inhibitorische Konzentration von AMD3465 unter 100 nM liegt. Die im Vergleich zu den anderen Zelllinien abweichende Rezeptorverteilung bei den SW-756-Zellen könnte sich auf eine Mutation des Rezeptors zurückführen lassen, welche die Bindung von CXCL12 nicht, jedoch die des Antagonisten beeinflusst. Entsprechend könnte die Antagonisten-bindende Struktur des Rezeptors derartig verändert sein, dass nur durch höhere Konzentrationen des Antagonisten ein mit den anderen Zelllinien vergleichbares Ergebnis herbeigeführt wird.

FC131 scheint im Vergleich zu AMD3465 ein geringeres antagonistisches Potenzial zu besitzen. Zellen, die mit 10 nM FC131 und CXCL12 inkubiert wurden, zeigten hinsichtlich der Detektierbarkeit des CXCR4 keine Unterschiede gegenüber Zellen, die mit dem CXCL12 allein inkubiert wurden. Erst bei 100 nM FC131 konnte ein Teil der Rezeptoren an der Membran detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass sich der IC<sub>50</sub>-Wert in diesem Bereich befindet. Ein ähnlich intensiver Rezeptorbesatz wie auch bei den Kontrollzellen ließ sich bei einer eingesetzten FC131-Konzentration von 1000 nM detektieren. Auch bei diesem Liganden zeigten die SW-756-Zellen ein abweichendes Rezeptorverhalten. Hier wurde auch bei hohen Konzentrationen an FC131 das CXCL12 nicht vom Rezeptor verdrängt; der CXCR4 ließ sich nicht an der Membran und nur in geringem Maße als intrazelluläre Cluster detektieren, was für eine Phosphorylierung des Rezeptors durch CXCL12 spricht.

Die antagonistische Potenz von <sup>nat</sup>Ga-CPCR4-2 wurde in der vorliegenden Arbeit beispielhaft an CXCR4-HEK293-Zellen und an OH-1-Zellen gezeigt. In den vorgestellten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich die CXCR4-Rezeptoren der OH-1-Zellen ähnlich denen der CXCR4-HEK293-Zellen und NCI-h69-Zellen antagonisieren lassen. Bei

der gleichzeitigen Inkubation der Zellen mit  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2 und CXCL12 konnte erst bei einer Konzentration von 1000 nM  $^{nat}\text{Ga}$ -CPCR4-2 der CXCR4 an der Membran detektiert werden. Die mit 100 nM Antagonist und CXCL12 inkubierten Zellen zeigten keinen Unterschied zu den mit CXCL12 allein behandelten Zellen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich alle vorgestellten, den CXCR4 endogen exprimierenden Zelllinien für die Erforschung von Antagonisten am CXCR4 eignen, wobei sich der CXCR4 bei den SW-756-Zellen vergleichsweise schwächer antagonisieren lässt. Das könnte ein Hinweis auf eine Rezeptormutation sein. Wong et al. (2008) konnten beispielsweise zeigen, dass bei verschiedenen Rezeptormutanten, die je eine Punktmutation aufwiesen, sowohl eine wesentliche Erhöhung der inhibitorischen Konzentration von AMD3465 als auch des  $\text{EC}_{50}$ -Wertes beobachtet werden konnte. Die Mutationen befanden sich dabei in allen Transmembrandomänen (außer V) oder in der extrazellulären Helix II. Eine Punktmutation in der Transmembrandomäne V erniedrigte dagegen die inhibitorische Konzentration des Antagonisten (Wong et al. 2008). Derartige Mutationen könnten auch innerhalb von Neoplasien vorkommen und ein aggressiveres Verhalten des Tumors bedingen.

Die nachfolgende Tabelle 23 gibt eine Übersicht über recherchierte  $\text{IC}_{50}$ - und  $\text{K}_i$ -Werte der vorgestellten Verbindungen.

**Tab. 23:** Recherchierte  $\text{IC}_{50}$ -Werte der in der Arbeit untersuchten Antagonisten.

| IC <sub>50</sub> [nM]    | Methode<br>Quelle   | K <sub>i</sub> [nM]                            | Quelle               |
|--------------------------|---|--|----------------------|
| AMD3465                  |   |  |                      |
| 10,38±1,99               | GTP-Bindungsstudien (EU-GTP) an Membranen von CCRM-CEM-Zellen (Bodart et al. 2009)                                    | K <sub>i</sub> = 41,7±1,2                      | (Bodart et al. 2009) |
| 41,7±1,2                 | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-CXCL12) an CCRM-CEM-Zellen (Wong et al. 2008)                          | K <sub>i</sub> = 49                            | Wong et al., 2008    |
| FC131                    |   |  |                      |
| 4,43±0,82                | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-FC131) an Jurkat-Zellen (Gourni et al. 2011)                           | In der Literatur sind keine Angaben zu finden. |                      |
| 31,5                     | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-CXCL12) an Jurkat-Zellen (Tanaka et al. 2010)                          |  |                      |
| 84±37                    | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-12G5-AK) an CXCR4-transfizierten HEK293-Zellen (Kobayashi et al. 2012) |  |                      |
| 126±68                   | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-CXCL12) an CXCR4-transfizierten HEK293-Zellen (Inokuchi et al. 2011)   |  |                      |
| 740                      | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-12G5-AK) an CXCR4-transfizierten COS-7-Zellen (Thiele et al. 2014)     |  |                      |
| <sup>68</sup> Ga-CPCR4-2 |   |  |                      |
| 4,99±0,72                | Kompetitive Bindungsstudien ( <sup>125</sup> I-FC131) an Jurkat-Zellen (Gourni et al. 2011)                           | In der Literatur sind keine Angaben zu finden. |                      |

Die in der Tabelle angegebenen  $IC_{50}$ -Werte wurden durch kompetitive Bindungsstudien ermittelt. Die Immunzytochemie ist im Gegensatz dazu eine Methode, die u.a. den Rezeptorbesatz, die räumliche Lage von Zellbestandteilen und deren Reaktion auf Stimuli mit Hilfe spezifischer AKs bildlich darstellen kann. Ein genauer  $IC_{50}$ -Wert kann mit dieser Methode jedoch nicht ermittelt werden; er lässt sich nur grob abschätzen.

Anhand der Tabelle wird deutlich, dass sich die in verschiedenen Studien ermittelten  $IC_{50}$ -Werte teilweise sehr stark voneinander unterscheiden. Mögliche Ursachen sind das genutzte Zellsystem und der Rezeptorbesatz der Zellen. Generell erscheinen die von Gourni et al. (2011) ermittelten  $IC_{50}$ -Werte im Vergleich zu denen der anderen Studien und den in dieser Arbeit grob abgeschätzten Werten sehr niedrig. Die Ergebnisse von Wong et al. (2008) für AMD3465 und von Kobayashi et al. (2012) und Inokuchi et al. (2011) für FC131 ähneln den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Gourni et al. 2011, Wong et al. 2008, Thiele et al. 2014, Inokuchi et al. 2011). Trotz vertiefter Recherche ist es nicht gelungen, Arbeiten zu finden, in denen der  $K_i$ -Wert von FC131 und  $^{nat}Ga$ -CPCR4-2 bestimmt wurde. Die beiden  $K_i$ -Werte, die für AMD3465 gefunden werden konnten, liegen nah beieinander und sind dem von Bodart et al. (2009) ermittelten  $IC_{50}$ -Wert sehr ähnlich (Bodart et al. 2009). Das spricht dafür, dass AMD3465 bereits bei einer Konzentration von 50 nM gut inhibitorisch wirksam ist.

Obwohl sich die untersuchten Liganden strukturell voneinander unterscheiden, scheint die Zugehörigkeit zur Substanzklasse keinen entscheidenden Einfluss auf die antagonistische Potenz zu haben, denn es wird nicht nur die inhibitorische Potenz pentapeptidischer Antagonisten durch einzelne funktionelle Gruppen bestimmt, sondern auch die Substituenten der kleinmolekularen Verbindungen beeinflussen deren Potenz maßgeblich (Inokuchi et al. 2011, Gudmundsson et al. 2009, Demmer et al. 2008). So ist beispielsweise der  $K_i$ -Wert von AMD3100, einem Bicyklam, fast zwanzigmal höher als bei dem strukturell ähnlichen Monozyklam AMD3465 (Wong et al. 2008).

## **5.4.2) Diagnostik von BP-NETs**

### **5.4.2.1) Möglichkeiten einer CXCR4-basierten Diagnose**

Obwohl für die immunhistochemische Diagnostik von TC und AC verschiedene neuroendokrine Marker zur Verfügung stehen und histologische Merkmale herangezogen werden können, ist die Unterscheidung zwischen kleinzelligem und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom in der Klinik mitunter schwierig. Dies ist ein Umstand, der weitere diagnostische Marker erfordert. Wie in Kapitel 4.3.3.1 dargestellt, unterscheiden sich TC, AC und SCLC hinsichtlich der Expression des CXCR4 (IRS) signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test:  $p < 0,001$ ). Dementsprechend ist im immunhistochemischen Nachweis des CXCR4 eine Ergänzung zu den bereits genutzten Markern zu sehen, der die mitunter schwierige



Unterscheidung zwischen den einzelnen Tumorentitäten erleichtern kann. Bei der Diagnose anhand von Nadelbiopsien, die mit einer Quetschung und folglich der morphologischen Zerstörung des Gewebes einhergehen, ließe sich die Immunfärbung des CXCR4 ebenfalls sinnvoll nutzen, denn die pathologische Unterscheidung der BP-NETs wird basierend auf deren Zellmorphologie getroffen.

Für die neben der Labordiagnostik zur Verfügung stehenden bildgebenden Verfahren ist der CXCR4 ebenfalls eine vielversprechende Zielstruktur und stellt eine Alternative zu der auf den Somatostatinrezeptoren basierenden Diagnostik von NETs dar.

Eine Szintigrafie erscheint, auf Grundlage der in dieser Arbeit ermittelten CXCR4-Expressionsdaten, für die Diagnostik des SCLC und stark CXCR4-exprimierender AC sinnvoll. Da das SPECT-CT einerseits Informationen zur Expressionsstärke und Größe der Zielstruktur und zusätzlich über deren Lage liefert, könnte anhand der so gewonnenen Daten das weitere therapeutische Vorgehen geplant werden, da chirurgische Maßnahmen von der Größe und der Lage des Tumors bestimmt werden.

Die Verfügbarkeit spezifischer Rezeptorliganden ist die Voraussetzung für eine nuklearmedizinische Diagnostik. Eine Reihe von Studien hat sich bereits mit der Erforschung und Charakterisierung von CXCR4-Liganden beschäftigt, was die Attraktivität des CXCR4 als Zielstruktur unterstreicht. Buckle et al. (2012) zeigen im Mausmodell, dass sich mit Hilfe von  $^{111}\text{Indium-DTPA-Ac-TZ14011}$ , einem Peptidantagonisten, bereits sehr kleine ( $10\text{ mm}^3$ ) CXCR4-positive Tumore mit Hilfe des SPECT-CT darstellen lassen (Buckle et al. 2012). Die spezifische Detektion CXCR4-exprimierender neoplastischer Strukturen mit Hilfe von Radiotracer im SPECT-CT bzw. PET konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen für Antagonisten verschiedener Substanzklassen im Tiermodell gezeigt werden (vgl. Tab. 24), wovon AMD3465 und Ga-CPCR4-2 in der vorliegenden Arbeit bereits vorgestellt worden sind.

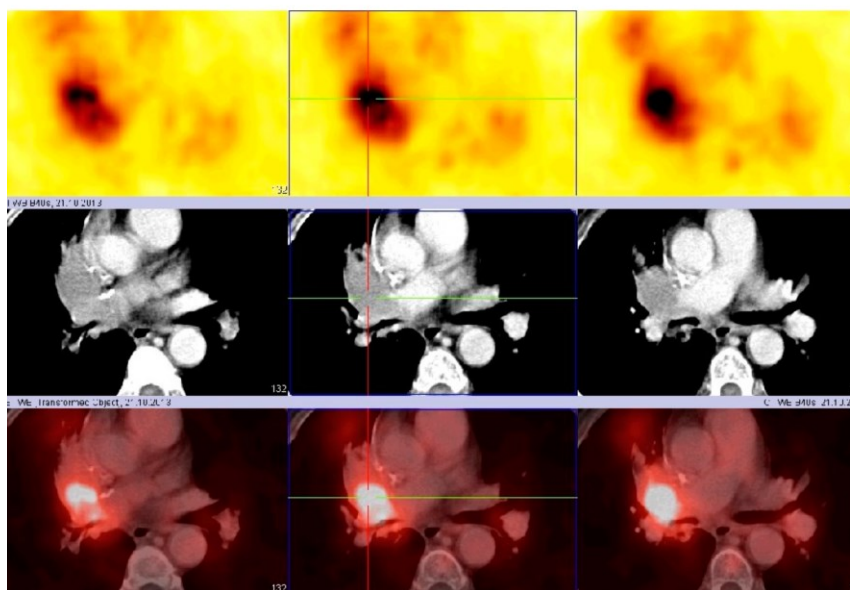
Ein generelles Problem der Radiosubstanzen für die Bildgebung ist jedoch ihre hohe Akkumulation in der Leber und der Niere (Kaemmerer et al. 2014, De Silva et al. 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde die antagonistische Potenz von  $^{\text{nat}}\text{Ga-CPCR4-2}$  an CXCR4-HEK293- und OH-1-Zellen immunzytochemisch dargestellt (vgl. Kap. 4.5.2). Gourni et al. konnten bereits 2011 mit  $^{68}\text{Gallium-CPCR4-2}$  zeigen, dass sich durch OH-1-Zellen erzeugte Xenograft-Tumore im Mausmodell mit Hilfe des PET gut darstellen lassen (Gourni et al. 2011). Beide in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien verhalten sich hinsichtlich der Detektierbarkeit des CXCR4 sehr ähnlich: bei einer eingesetzten Konzentration von  $1000\text{ nM } ^{\text{nat}}\text{Ga-CPCR4-2}$  plus  $20\text{ nM CXCL12}$  erscheint der CXCR4, wie bei den Kontrollzellen auch, an der Membran. Gourni et al. (2011) geben den  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $^{\text{nat}}\text{Ga-CPCR4-2}$  mit  $4,99 \pm 0,72\text{ nM}$  an, er wurde mit Hilfe kompetitiver Bindungsstudien bei Jurkat-Zellen ermittelt (Gourni et al. 2011).

**Tab. 24:** CXCR4-Antagonisten in der diagnostischen Bildgebung.

| Modell/ Organismus   | Substanzname                       | Substanzklasse              | Methode  | Quelle                                    |
|--|------------------------------------|-----------------------------|----------|---|
| Xenograft-Mausmodell: U78-CXCR4-Zellen (stabil transfiziert)                                   | <sup>111</sup> Indium-DOTA-POL3026 | β-Hairpin Peptidomimetikum  | SPECT-CT | (Lesniak et al. 2015)                     |
| Xenograft-Mausmodell: U78-CXCR4-Zellen (stabil transfiziert)                                   | <sup>125</sup> Iod-12G5            | Antikörper                  | SPECT-CT | (Nimmagadda et al. 2009)                  |
| Xenograft-Mausmodell: humane Mammakarzinom-Zelllinie   | <sup>67</sup> Gallium-AMD3100      | Kleinmolekularer Antagonist | SPECT    | (Aghanejad et al. 2014)                   |
| Xenograft-Mausmodell: CHO-CXCR4-Zellen (stabil transfiziert), Ligandenspezifische Akkumulation | <sup>64</sup> Kupfer-AMD3100       | Kleinmolekularer Antagonist | PET      | (Jacobson et al. 2009, Weiss et al. 2012) |
| Xenograft-Mausmodell: U78-CXCR4-Zellen (stabil transfiziert)                                   | <sup>64</sup> Kupfer-AMD3465       | Kleinmolekularer Antagonist | PET-CT   | (De Silva et al. 2011)                    |
| Xenograft-Mausmodell: U78-CXCR4-Zellen (stabil transfiziert)                                   | <sup>68</sup> Gallium-CCIC16       | Peptid, TN14003-Derivat     | PET-CT   | (George et al. 2014)                      |
| Xenograft-Mausmodell: OH-1-Zellen  | <sup>68</sup> Gallium-CPCR4-2      | Zyklisches Pentapeptid      | PET      | (Gourni et al. 2011)                      |

In der Nuklearmedizinischen Klinik der Zentralklinik Bad Berka wurde mit <sup>68</sup>Ga-CPCR4-2 bereits ein erstes PET-CT von einem Patienten mit SCLC erstellt (vgl. Abb. 34). <sup>68</sup>Ga-CPCR4-2 eignet sich demnach für die klinische Anwendung und erlaubt die bildliche Darstellung des CXCR4 im Patienten. Basierend auf den so gewonnenen Informationen bezüglich der Rezeptorexpression könnte sich eine Radiopeptidtherapie anschließen (Kaemmerer et al. 2014).



**Abb. 34:** <sup>68</sup>Ga-CPCR4-2 PET/CT bei SCLC-Patient (Transversaler Blickwinkel). Lokales Rezidiv eines zentral lokalisierten SCLC. Obere Bildabfolge: PET-Aufnahme. Mittlere Bildabfolge: CT-Aufnahme. Untere Bildabfolge: PET-CT-Überlagerungsdarstellung (Kaemmerer et al. 2014).

#### 5.4.2.2) Immunhistochemische Bewertung der CXCR4-Expression

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden neben dem Auswertungssystem nach Remmele und Stegner (IRS) zusätzlich mit dem Her2neu-Score und dem EGFR-Score ausgewertet (vgl. Kap. 4.3.4).

**Tab. 25:** Beispielhafte Bewertung und Interpretation der Immunfärbung mit verschiedenen Scores.

| Färbung   | IRS-Wert                                  | EGFR-Wert   | Her2neu-Wert            |
|---|---|---|-------------------------|
| Nur wenige Zellen (1-2%) sind intensiv gefärbt                        | 3 von 12 $\triangleq$ schwach positiv     | 6 von 300 $\triangleq$ negativ                        | 0 $\triangleq$ negativ  |
| 90% Zellen sind schwach gefärbt                                       | 4 von 12 $\triangleq$ mäßig stark positiv | 90 von 300 $\triangleq$ schwach positiv               | 1+ $\triangleq$ negativ |
| 70% Zellen sind schwach, 8% sind stark und 8% sind sehr stark gefärbt | 12 $\triangleq$ stark positiv             | 70+16+24=110 von 300 $\triangleq$ mäßig stark positiv | 1+ $\triangleq$ negativ |

Mit Hilfe aller drei Scores wird die Stärke der CXCR4-Expression in vergleichbarer Weise abgebildet, TC zeigen stets die schwächste und SCLC die stärkste Expression (TC < AC < SCLC). Dennoch können sich die mit den verschiedenen Scores ermittelten Werte für eine Probe gegebenenfalls stark voneinander unterscheiden (vgl. Tab. 25).

Durch den IRS erfährt die Intensität der Färbung eine stärkere Gewichtung als es bei den beiden anderen Scores der Fall ist. Das kann zu einer tendenziell höheren Bewertung des Präparates führen. Die nahezu perfekte Korrelation zwischen dem IRS und dem EGFR-Score ( $r=0,97$ ;  $p<0,001$ ) spricht jedoch dafür, dass beide Bewertungssysteme die Stärke der CXCR4-Expression in vergleichbarer Weise abbilden und dass die Bewertung des Präparates in der Regel nicht durch wenige intensiv gefärbte Zellen maßgeblich verändert wird.

Der Her2neu-Score korreliert mit den beiden eben genannten Bewertungssystemen weniger stark (IRS:  $r=0,825$ ; EGFR-Score:  $r=0,787$ ;  $p<0,001$ ). Das ist damit zu begründen, dass durch den Her2neu-Score eine positive Färbung erst bei einer ausreichend großen Zahl gefärbter Zellen berücksichtigt wird. Jedoch korreliert der Her2neu-Score besser als die beiden anderen Bewertungssysteme mit der Überlebenszeit, ungeachtet welcher Zeitraum betrachtet wird, und dem mRNA-Level. Das spricht zunächst dafür, dass durch die beiden anderen Scores kleinere, intensiv gefärbte Zellgruppen möglicherweise zu hoch bewertet werden könnten. Andererseits wurden bei der Klassierung der Werte der Auswertungs-Scores in Bezug auf die Gesamt-Überlebenszeit der Patienten nur für den IRS und den EGFR-Score Klassierungen vorgeschlagen: 2 für den IRS und 3 für den EGFR-Score. Diese Werte sind sehr gering und sprechen gegen die Nutzung Her2neu-Scores, durch den sich derartig geringe Färbungen nicht erfassen lassen.

Dennoch besitzen alle drei Auswertungssysteme Nachteile. Durch den Her2neuScore werden nur ausreichend große Mengen gefärbter Zellen berücksichtigt, mit dem IRS kann es im Gegensatz dazu zu einer Überbewertung kleiner, intensiv gefärbter Zellgruppen kommen. Der EGFR-Score erfasst die Färbung im Vergleich zu den beiden anderen Score-Systemen am besten, ist jedoch in der Auswertung aufwändiger.

Der Her2neu-Score wies die höchsten Korrelationen mit dem mRNA-Level und dem Überleben der Patienten, egal welcher Zeitraum zugrunde gelegt wurde, auf. Das spricht zunächst dafür, diesen Score in der Klinik zu nutzen.

Andererseits werden mit dem IRS kleine, intensiv gefärbte Zellgruppen, bei denen es sich um CSCs handeln könnte, stärker berücksichtigt, als es bei den beiden anderen Score-Systemen der Fall ist.

### **5.4.3) Pharmakotherapie**

Die Pharmakotherapie bei BP-NETs orientiert sich an der Tumorentität und dem Stadium der Erkrankung. Obgleich eine Vielzahl therapeutischer Optionen zur Verfügung steht, ist deren Wirksamkeit von der Aggressivität des Tumors (Mitoserate, Metastasierung) abhängig.

Als eine mögliche Maßnahme steht die chirurgische oder bronchoskopische Entfernung des Tumors zur Verfügung, die in der Regel nur in einem frühen Tumorstadium durchgeführt werden kann. Es werden beim TC auf diese Weise gute Ergebnisse hinsichtlich des rezidivfreien Überlebens erreicht (Luckraz et al. 2006).

Das AC, das bezüglich der Aggressivität zwischen TC und SCLC anzusiedeln ist und hinsichtlich der Stärke der CXCR4-Expression eine große Spannweite aufweist, wird nach Entfernung adjuvant mittels Chemotherapie, Radiotherapie oder mit Somatostatinanaloga, wenn die entsprechenden Somatostatin-Rezeptoren erhöht exprimiert vorliegen, therapiert (Sayeg et al. 2014). Somatostatin-Rezeptoren bieten einen diagnostischen und therapeutischen Angriffspunkt, der mit dem des CXCR4 vergleichbar ist. Dementsprechend ist die PRRT als ein Verfahren anzusehen, in dem gezielt CXCR4-überexprimierende Zellen angegriffen und zerstört werden können. Eine derartige Behandlung mit Somatostatinanaloga, wobei es sich jedoch um Agonisten handelt, führt bei der Hälfte der Patienten zur Verbesserung der Symptome (Sayeg et al. 2014). Vor allem für das SCLC, bei dem in der vorliegenden Arbeit in der Regel ein sehr hoher CXCR4-Rezeptorbesatz gefunden wurde, ist eine entsprechende CXCR4-basierte Therapiemöglichkeit vielversprechend. Allerdings würde die Nutzung von radioaktiv-markierten Antagonisten zu einer vergleichsweise schwächeren Anreicherung des Radionuklids in der Zelle führen, als es bei Agonisten der Fall ist. Dementsprechend könnte die Therapie bei gleicher Strahlendosis weniger effizient sein. Weiterhin würde der Einsatz von Antagonisten in der PRRT zu ei-

ner Zerstörung des umliegenden Gewebes führen. Der Einsatz von CXCR4-Agonisten wäre eine Möglichkeit, die durch Antagonisten bedingten unerwünschten Wirkungen zu umgehen, andererseits würden durch die Rezeptoraktivierung möglicherweise andere unerwünschte Wirkungen, wie Proliferation oder Migration der Zellen, ausgelöst.

Daneben ist die Antagonisierung des CXCR4-Rezeptors und dementsprechend die Blockade der Signalweiterleitung, was zur Hemmung der Proliferation führt, eine therapeutische Option bei Krebserkrankungen. Es wurden bereits entsprechende klinische Studien durchgeführt, jedoch sind bislang so gut wie keine Ergebnisse publiziert worden (Weitzenfeld und Ben-Baruch 2014). Mit Hilfe von Migrations- bzw. Proliferationsassays bei Krebszelllinien unter Nutzung verschiedener CXCR4-spezifischer Antagonisten konnte in vitro jedoch wiederholt das therapeutische Potenzial des CXCR4 gezeigt werden (Domanska et al. 2013, Kim et al. 2011, Kwong et al. 2009).

Galsky et al. (2014) haben die Ergebnisse einer ersten klinischen Phase-I-Studie 2014 veröffentlicht, in der sie Patienten mit soliden Tumoren in Form einer subkutanen Injektion mit dem peptidischen CXCR4-Antagonisten LY2510924 behandelt haben. Hauptziel der Untersuchung war die Erhebung der geeigneten Dosis für eine Phase-II-Studie. Außerdem sollten die Pharmakokinetik, die Wirksamkeit und pharmakodynamische Aspekte, einschließlich Mobilisierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen in das periphere Blut, untersucht werden (Galsky et al. 2014). Auch der CXCR4-Antagonist AMD3100, der unter dem Handelsnamen Plerixafor bei Patienten mit multiplen Myelom zur Mobilisierung von Stammzellen aus dem Knochenmark ins periphere Blut zugelassen ist (Mahaseth und Kaufman 2012, Proudfoot et al. 2010), erfordert die Berücksichtigung derartiger unerwünschter Arzneimittelwirkungen. Galsky et al. (2014) konnten einen Anstieg von Neutrophilen und CD34<sup>+</sup>-Zellen im peripheren Blut unter der Behandlung mit LY2510924 verzeichnen. Weitere unerwünschte Wirkungen waren Müdigkeit und Dyspnoe. 20% der Probanden zeigten unter der Behandlung einen progressionsfreien Verlauf über 2 oder mehr Behandlungszyklen (28 Tage). Das Studiendesign sah allerdings keine Kontrollgruppe vor, so dass die Autoren keine vergleichenden Aussagen treffen konnten. Interessant ist, dass ein Patient mit einem neuroendokrinen Lungentumor über 12 Behandlungszyklen hinweg stabil war. Jedoch wurde bei keinem der Studienteilnehmer die Expression des CXCR4 gesondert erhoben (Galsky et al. 2014). Folglich kann über einen Zusammenhang zwischen der Behandlung mit dem Antagonisten und dem Verlauf der Erkrankung nur spekuliert werden. Da der CXCR4 auch in die Tumor-Stroma-Interaktion involviert zu sein scheint, was eine Resistenz der Tumorzellen gegenüber einer klassischen Chemotherapie bedingen könnte, sind therapeutische Effekte von CXCR4-Inhibitoren auch in dieser Hinsicht vorstellbar (Hartmann et al. 2005, Hartmann et al. 2004).

Als problematisch bei der Behandlung mit CXCR4-Antagonisten könnte sich jedoch der Umstand erweisen, dass Zellen innerhalb lymphatischer Strukturen, v.a. im Bereich der Keimzentren, eine physiologischerweise sehr starke Expression des CXCR4 aufweisen (Diplomarbeit Ch. Reimann, 2012). Hier könnte es zur Akkumulation der Antagonisten im Rahmen einer PRRT kommen, was zum einen aufgrund der Hemmwirkung auf die B-Zellen möglicherweise zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt und zum anderen aufgrund der Strahlendosis zum Untergang der Zellen selbst.

CXCL12, der endogene CXCR4-Ligand, scheint den Verlauf der Erkrankung ebenfalls zu beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass CXCL12 eine Aktivierung von Integrin bedingt, wodurch eine erhöhte Adhäsion der Tumorzellen beim SCLC bewirkt wird (Burger et al. 2003).

#### **5.4.4) CXCR4-abhängige Prognose**

Das Auftreten des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren und der Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Überleben bei BP-NETs verdeutlichen, dass dem CXCR4 neben einer möglichen diagnostischen und therapeutischen auch eine prognostische Bedeutung zukommen könnte.

So konnte nicht nur in der vorliegenden Untersuchung, sondern auch in einer Vielzahl anderer Studien, die sich mit der Expression des CXCR4 in neoplastischen Gewebe beschäftigt haben, ein Zusammenhang zwischen der erhöhten CXCR4-Expression und einer schlechteren Prognose nachgewiesen werden (Wald et al. 2013, Hartmann et al. 2005, Hartmann et al. 2004, Otsuka et al. 2011).

##### **5.4.4.1) Verschiedene Tumorentitäten**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Präparate verschiedener Tumore (vgl. Kap. 4.2, Abb. 10) lassen sich anhand der Stärke der CXCR4-Expression, untergliedert in drei Gruppen aufführen (vgl. Tab. 26). In Tabelle 26 ist zusätzlich die 5-Jahres-Überlebensrate, wie sie in verschiedenen Studien und Erhebungen publiziert wurde, angegeben.

Anhand der Tabelle 26 wird deutlich, dass zwischen den aufgeführten Tumorentitäten, die anhand der Expressionsstärke des CXCR4 gruppiert wurden, und den angegebenen Überlebensraten kein direkter Zusammenhang ersichtlich ist. Auch Tumore, die im gezeigten Präparat (vgl. Kap. 4.2, Abb. 10) nur wenige Zellen mit einer starken Expression aufweisen, haben mit unter 50% eine relativ niedrige 5-Jahres-Überlebensrate, wie es beispielsweise beim Ovarialkarzinom der Fall ist. Die aufgeführten Tumore stellen eine Auswahl von Neoplasien dar, deren CXCR4-Expression bereits in einer früheren Arbeit (Diplomarbeit: Ch. Reimann, 2012) untersucht wurde, so dass die gezeigten Bildausschnitte für das jeweilige Präparat charakteristisch sind. Eine Erkenntnis dieser Arbeit war, dass bei 14 von 20 untersuchten Tumorentitäten eine Expression des CXCR4 detek-

tiert werden konnte, wobei die Anzahl der untersuchten Präparate stark schwankte (n=2 bis n=51). Von Tumorentitäten, bei denen keine Expression des CXCR4 festgestellt werden konnte, stand nur eine relativ geringe Anzahl von Präparaten (n=3 bis n=8) zur Verfügung. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass bei einer größeren Stichprobe der Rezeptor möglicherweise hätte doch detektiert werden könnten. Außerdem ist in der Literatur für eine Vielzahl der untersuchten Tumore eine erhöhte CXCR4-Expression beschrieben (vgl. Tab. 23). Dennoch scheint bei einigen Tumoren die Wahrscheinlichkeit einer CXCR4-Expression höher als bei anderen zu sein, beispielsweise beim SCLC, dem Thymom oder dem Harnblasenkarzinom.

**Tab. 26:** Überlebensrate der in der Arbeit vorgestellten Tumore.

| Tumor   | Häufigster Ursprung   | 5-Jahres-Überlebensrate  |  |
|---|---|--|--|
| Starke Expression des CXCR4 bei nahezu allen Zellen   |   |  |  |
| BZL   | B-Zelle aus Keimzentrum sekundär lymphatischer Organe             | 30% - 50%<br>Non-Hodgkin-Lymphome: 59%*  | (Schneider et al. 2011, Friedberg und Fisher 2008) |
| MZK   | Neuroendokrine Zellen der Haut                                    | Stage I, II: 64%<br>Stage III: 39%<br>Stage IV: 18%                                | (Ramahi et al. 2013)                               |
| SCLC  | Neuroendokrine Zellen der Lunge                                   | 6,4%<br>Lungenkrebs allgemein: 17%*  | (Kazarian und Laird-Offringa 2011)                 |
| Starke Expression des CXCR4 bei einem Teil der Zellen |   |  |  |
| BK  | Urothelzellen   | 44%*<br>~10-40%  | (Pedrosa et al. 2015)                              |
| AC  | Neuroendokrine Zellen der Lunge                                   | Lungenkrebs allgemein: 17%*<br>71% (Stage I), 46% (Stage II) 37% (Stages III & IV) | (Beasley et al. 2000)                              |
| PCZ   | Chromaffine Zellen des Nebennierenmarks oder anderer Lokalisation | 40-71%<br>Nebenniere und andere endokrine Drüsen: 46%*                             | (Ayala-Ramirez et al. 2011)                        |
| Starke Expression des CXCR4 bei wenigen Zellen        |   |  |  |
| OvK   | Zellen des Ovars  | 38%*<br>30-60%   | (Kommoss et al. 2009)                              |
| LMS   | Muskelzellen, Überlebensrate ist von betroffener Entität abhängig | ~ 15-25% (Herz)<br>~ 55% (untere Hohlvene)   | (Wang et al. 2015)<br>(Wachtel et al. 2014)        |
| AKL   | Lungenepithel (Azini)   | Lungenkrebs allgemein: 17%*<br>75%-85% (Stage I)<br>1%-80% (Stage IV-I)            | (Sawada et al. 2007)<br>(Heigener et al. 2008)     |

\* Quelle: Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.): Krebs in Deutschland 2009/2010. 9. Ausgabe. Berlin, 2013.

**Abkürzungen:** AKL: Adenokarzinom der Lunge, BZL: B-Zell-Lymphom, BK: Blasenkarzinom, LMS: Leiomyosarkom, MZK: Merkelzell-Karzinom, OvK: Ovarialkarzinom, PCZ: Phäochromozytom.

Obwohl sich mit Hilfe des UMB-2 die CXCR4-Expression immunhistochemisch sehr gut darstellen lässt, kann pauschal keine Verbindung zwischen der Rezeptor-Expression und

dem 5-Jahres-Überleben hergestellt werden, da der Krankheitsverlauf auch von vielen weiteren Faktoren beeinflusst wird. Dennoch scheinen einige Tumorentitäten wie das SCLC in der Mehrzahl der Fälle eine Überexpression des CXCR4-Rezeptors aufzuweisen; insbesondere bei diesen sollte das diagnostische und therapeutische Potential des Rezeptors genutzt werden.

#### **5.4.4.2) BP-NETs – Cut-off-Werte**

Aus dem Expressionslevel des CXCR4 können für die BP-NETs prognostische Informationen gewonnen werden, jedoch sollten diese sinnvoll durch die TNM-Klassifizierung ergänzt werden, denn Lymphknotenbefall und Metastasierung beeinflussen den Verlauf der Erkrankung und bestimmen das therapeutische Vorgehen (Fox et al. 2013). An einem Cut-off-Wert könnte sich, neben der prognostischen Aussage, auch die Wahl therapeutischer Maßnahmen orientieren.

Die Prognose der BP-NETs korreliert mit der Expression des CXCR4: TC haben eine sehr gute Prognose, in der vorliegenden Arbeit wurde hier insgesamt eine sehr schwache CXCR4-Expression festgestellt, AC haben eine weniger gute Prognose und eine erhöhte CXCR4-Expression und die Prognose des SCLC ist sehr schlecht, wobei die CXCR4-Expression in der Regel hoch ist (Travis et al. 1998). In dem Maß wie die Expression des CXCR4 zunimmt, scheint sich die Prognose zu verschlechtern. Das ließ sich mit den Kaplan-Meier-Überlebenskurven zeigen.

Die mit SPSS durchgeführte Klassierung der Ergebnisse der verschiedenen Auswertungsscores hinsichtlich der Gesamt-Überlebenszeit der Patienten verdeutlicht, dass bereits eine sehr geringe Expression des CXCR4 die Überlebenswahrscheinlichkeit reduziert. Die auf diese Weise ermittelten Werte könnten als Cut-off-Werte genutzt werden: IRS=2 und EGFR-Score=3. Diese sehr niedrigen Cut-off-Werte geben einen Hinweis darauf, dass nicht nur eine Überexpression, sondern jegliche Expression des CXCR4 auf Tumorzellen prognostisch von Bedeutung ist. Außerdem lässt sich diese geringe Expression mit dem Her2neu-Score nicht detektieren, da bei einer EGFR-Score-Bewertung von 4 höchstens 4% aller Zellen eine positive Färbung aufweisen können.

Da sich die PCR-Daten ebenfalls in Bezug auf das Patientenüberleben klassieren ließen ( $\Delta C_T$ -Wert: 36,35) und mit Hilfe der Kaplan-Meier-Überlebenskurven (vgl. Abb. 22, 26) verdeutlicht werden konnte, dass bei mäßigen und hohen mRNA-Werten das kumulative Überleben niedriger ist, spricht das für die mögliche Verwendung der PCR im Rahmen einer „Schnelldiagnose“ in der Klinik. Mit Hilfe der PCR könnte dementsprechend das CXCR4-mRNA-Level, im Vergleich zur Immunhistochemie, ohne größere Wartezeiten, bestimmt werden und es könnten darauf basierend erste therapeutische Schritte geplant werden.



Da die durch Dr. Wirtz etablierte RNA-Isolation aus in Paraffin eingebettetem Gewebe auch noch nach vielen Jahren der Lagerung möglich ist, könnte und sollte der Zusammenhang zwischen der CXCR4-Protein- und mRNA-Expression sowie der Zusammenhang zwischen dem mRNA-Level und dem Überleben in einer weiteren Studie, für die Patientendaten zur Verfügung stehen, bestätigt werden.

## 6) Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung des UMB-2 zur Darstellung der CXCR4-Expression in humanen neoplastischen Gewebeproben nachgewiesen werden. Das verdeutlicht das Potential des UMB-2 für die diagnostische Nutzung im Rahmen immunhistochemischer Färbungen. Die Ermittlung spezifischer Färbemuster offenbart weitere Angriffspunkte, beispielsweise in Bezug auf CSCs, deren Erforschung insbesondere in therapeutischer Hinsicht vielversprechend ist. In der vorliegenden Arbeit konnte eine erhöhte Rezeptorexpression in bestimmten Tumorentitäten, insbesondere im kleinzelligen Bronchialkarzinom, gezeigt werden. Dies unterstreicht eine potentielle Nutzung des CXCR4 nicht nur für diagnostische, sondern auch für therapeutische Zwecke bei dieser Tumorentität. Aber auch bei anderen Tumorentitäten, wie dem B-Zell-Lymphom oder dem Harnblasenkarzinom könnte der CXCR4, aufgrund seiner erhöhten Expression, für die Diagnose und Therapie bedeutsam sein. Die Erhebung des CXCR4-mRNA-Levels zusätzlich zum CXCR4-Protein-Level ist, wie anhand des mit SPSS errechneten Cut-off-Wertes gezeigt werden konnte, bei BP-NETs sinnvoll und könnte ergänzend für die Diagnose und prognostische Aussagen genutzt werden.

Die Western-Blot-Analyse und die Immunzytochemie eignen sich für die Erforschung grundlegender Zusammenhänge der Rezeptorregulation und des Signalings. Faktoren, welche die CXCR4-Expression und Funktionalität beeinflussen, können hier unter standardisierten Bedingungen untersucht werden und in einem zweiten Schritt an histologischen Präparaten oder im Tiermodell überprüft werden. Dabei erscheinen hypoxische Bedingungen, CSCs und weitere Chemokinrezeptoren wie der CXCR3 und der CXCR7 sowie deren endogene Liganden als interessante Untersuchungsstrukturen, deren Erforschung die mögliche diagnostische und therapeutische Nutzung des CXCR4 beeinflussen könnte. Dementsprechend ist in einer Forschung, die auf Interaktionen zwischen verschiedenen Einflussfaktoren und Zielstrukturen fokussiert, eine sinnvolle Herangehensweise für die zukünftige Etablierung neuer Therapiekonzepte zu sehen.

Die fortschreitende Entwicklung, klinische Erforschung und zum Teil bereits auch klinische Nutzung von CXCR4-Antagonisten verdeutlichen darüber hinaus die Bedeutung, das Potential und die Aktualität des CXCR4 als Zielstruktur für die Diagnose und die Therapie solider Tumore.

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abb. 1:</b> Die Chemokinrezeptoren CXCR3, CXCR4 und CXCR7 und ihre endogenen Liganden.....   | 3  |
| <b>Abb. 2:</b> Darstellung der regulären Hauptstruktur von CXCL12 $\alpha$ .....  | 4  |
| <b>Abb. 3:</b> Modell der CXCL12-Bindung an den CXCR4 nach Crump et al. (1997).....   | 7  |
| <b>Abb. 4:</b> CXCR4-Antagonisten.....  | 16 |
| <b>Abb. 5:</b> Struktur der beiden Pentapeptide FC131 und FCA004 (Oishi and Fujii, 2012)....  | 16 |
| <b>Abb. 6:</b> Struktur der in der Arbeit verwendeten Antagonisten. ....  | 22 |
| <b>Abb. 7:</b> Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. ....  | 28 |
| <b>Abb. 8:</b> Charakterisierung der CXCR4-Antikörper. ....   | 35 |
| <b>Abb. 9:</b> Zytoblöcke und Tumorpräparate. ....  | 37 |
| <b>Abb. 10:</b> Expression des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren.....   | 38 |
| <b>Abb. 11:</b> CXCR4-Expression in TC. ....  | 40 |
| <b>Abb. 12:</b> CXCR4-Expression in AC. ....  | 41 |
| <b>Abb. 13:</b> CXCR4-Expression in SCLC.....   | 41 |
| <b>Abb. 14:</b> Vergleichende Darstellung des IRS bei TC, AC und SCLC. ....   | 42 |
| <b>Abb. 15:</b> mRNA-Level innerhalb der verschiedenen BP-NETs, n=60. ....  | 43 |
| <b>Abb. 16:</b> Korrelation zwischen IRS und mRNA-Level in Abhängigkeit von der Tumorentität (n=51). ....                                     | 44 |
| <b>Abb. 17:</b> Altersverteilung bei TC, AC und SCLC sowie mittlerer IRS in Abhängigkeit von der Tumorentität und dem Alter. ....             | 45 |
| <b>Abb. 18:</b> Geschlechtsverteilung bei TC, AC und SCLC sowie Höhe des IRS in Abhängigkeit von der Tumorentität und dem Geschlecht. ....    | 46 |
| <b>Abb. 19:</b> Geschlechtsspezifische Gesamt-Überlebenskurven. ....  | 47 |
| <b>Abb. 20:</b> Zusammenhang zwischen Tumorentität und Überleben.....   | 48 |
| <b>Abb. 21:</b> Zusammenhang zwischen der CXCR4-Expression und dem Überleben.....   | 49 |
| <b>Abb. 22:</b> Zusammenhang zwischen dem CXCR4-mRNA-Level und dem Überleben.....   | 49 |
| <b>Abb. 23:</b> Grafischer Vergleich der Score-Systeme. ....  | 50 |
| <b>Abb. 24:</b> Überlebenskurven für das Gesamt-Überleben, basierend auf dem EGFR-Score (A) oder dem Her2neu-Score (B).....                   | 51 |
| <b>Abb. 25:</b> Überlebenskurven, basierend auf verschieden gruppierten IRS.....  | 53 |
| <b>Abb. 26:</b> Überlebenskurven, basierend auf den SPSS-Klassierungen.....   | 53 |
| <b>Abb. 27:</b> Punktuelle Expression des CXCR4 bei TC, AC und SCLC. ....   | 54 |
| <b>Abb. 28:</b> Expression des CXCR4 in und um Tumornekrosen. ....  | 55 |
| <b>Abb. 29:</b> Inhomogene Expression des CXCR4 bei verschiedenen Tumoren. ....   | 55 |
| <b>Abb. 30:</b> Endogene Expression des CXCR4 in Krebszelllinien. ....  | 56 |
| <b>Abb. 31:</b> Antagonisierung der CXCL12-Wirkung am CXCR4 bei verschiedenen Zelllinien durch AMD3465. ....                                  | 58 |
| <b>Abb. 32:</b> Antagonisierung der Wirkung von CXCL12 am CXCR4 bei verschiedenen Zelllinien durch FC131. ....                                | 58 |
| <b>Abb. 33:</b> Antagonisierung der CXCL12-Wirkung am CXCR4 bei CXCR4-HEK293- und OH-1-Zellen durch <sup>nat</sup> Ga-CPCR4-2 (CPCR4-2). .... | 59 |
| <b>Abb. 34:</b> <sup>68</sup> Ga-CPCR4-2 PET/CT bei SCLC-Patient (Transversaler Blickwinkel). ....  | 77 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Tab. 1:</b> Klassen der Untereinheiten und Effektorproteine von G $\alpha$ -Proteinen .....   | 5  |
| <b>Tab. 2:</b> Kriterien von BP-NETs .....   | 11 |
| <b>Tab. 3:</b> Verwendete Chemikalien.....   | 19 |
| <b>Tab. 4:</b> Übersicht über die verwendeten Zelllinien, Bezugsperson und Art der Zelllinie. ..   | 20 |
| <b>Tab. 5:</b> Medienzusammensetzung für die genutzten Zelllinien.....   | 22 |
| <b>Tab. 6:</b> Gruppierung und Interpretation des Immunreaktivitäts-Scores nach Remmele<br>und Stegner .....   | 30 |
| <b>Tab. 7:</b> Gruppierung und Interpretation des EGFR-Scores. ....  | 30 |
| <b>Tab. 8:</b> Ermittlung und Interpretation des Her2neu-Scores. ....  | 31 |
| <b>Tab. 9:</b> Einteilung der $\Delta$ C-T-Werte in Quartile und Interpretation. ....  | 32 |
| <b>Tab. 10:</b> Interpretation des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten r. ....  | 33 |
| <b>Tab. 11:</b> Charakterisierung der untersuchten Patientenstichprobe.....  | 39 |
| <b>Tab. 12:</b> Mann-Whitney-U-Tests. Prüfvariable: IRS. ....  | 43 |
| <b>Tab. 13:</b> Mann-Whitney-U-Tests. Prüfvariablen: mRNA-Level und mRNA-Level<br>gruppiert.....   | 44 |
| <b>Tab. 14:</b> Lagemaße für IRS und mRNA-Level bei AC, TC und SCLC.....   | 45 |
| <b>Tab. 15:</b> Korrelation der verschiedenen Überlebensvariablen untereinander. ....  | 47 |
| <b>Tab. 16:</b> Korrelation zwischen dem IRS und den Überlebenszeiträumen.....   | 49 |
| <b>Tab. 17:</b> Korrelation zwischen dem mRNA-Level und den Überlebenszeiträumen. ....   | 50 |
| <b>Tab. 18:</b> Korrelationen zwischen den Scores (IRS, EGFR, Her2neu), .....  | 51 |
| <b>Tab. 19:</b> Korrelation der verschiedenen Auswertungs-Scores mit dem mRNA-Level<br>(n=51). ....  | 51 |
| <b>Tab. 20:</b> Verarbeitete Fälle zur Erzeugung der kumulativen Überlebenskurven,<br>basierend auf dem Gesamt-Überleben (EGFR-Score, Her2neu-Score). .... | 52 |
| <b>Tab. 21:</b> Korrelation der Auswertungs-Scores mit den verschiedenen<br>Überlebenszeiträumen. ....   | 52 |
| <b>Tab. 22:</b> In der Literatur immunhistochemisch ermittelte Expression des CXCR4 in<br>verschiedenen Tumorentitäten. ....                               | 64 |
| <b>Tab. 23:</b> Recherchierte IC <sub>50</sub> -Werte der in der Arbeit untersuchten Antagonisten. ....  | 74 |
| <b>Tab. 24:</b> CXCR4-Antagonisten in der diagnostischen Bildgebung. ....  | 77 |
| <b>Tab. 25:</b> Beispielhafte Bewertung und Interpretation der Immunfärbung mit<br>verschiedenen Scores.....   | 78 |
| <b>Tab. 26:</b> Überlebensrate der in der Arbeit vorgestellten Tumore.....   | 82 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                |   |
|----------------|---|
| ABC            | Avidin-Biotin-Komplex   |
| Abb.           | Abbildung   |
| AC             | Atypisches Karzinoid  |
| AEC            | Aminoethylcarbazol  |
| AK             | Antikörper  |
| ALDH1          | Aldehyd-Dehydrogenase-1   |
| APS            | Ammoniumpersulfat   |
| Aqua bidest.   | destilliertes Wasser  |
| AS             | Aminosäure  |
| BP-NETs        | Bronchopulmonale neuroendokrine Tumore                                      |
| CALM2          | Calmodulin 2  |
| CCR5           | CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor 5, CD195   |
| CSC            | Cancer stem cell ( <i>engl.</i> ), Krebsstammzelle                          |
| C-T            | Cycle Threshold ( <i>engl.</i> ), Zyklusschwellenwert (PCR)                 |
| CT             | Computertomografie  |
| C-Terminus     | Carboxy-Terminus  |
| CXCL11         | CXC-Motiv-Chemokinligand 11, syn. I-TAC                                     |
| CXCL12         | CXC-Motiv-Chemokinligand 12, syn. SDF-1                                     |
| CXCL14         | CXC-Motiv-Chemokinligand 14   |
| CXCR3          | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3, CD183   |
| CXCR4          | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, CD184   |
| CXCR7          | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 7, RDC1  |
| DMEM           | Dulbecco's modified Eagle Medium  |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid  |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure  |
| DOTA           | 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure                      |
| <i>E.coli</i>  | <i>Escherichia coli</i>   |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat  |
| EGF            | epidermal growth factor   |
| EGFR           | epidermal growth factor receptor ( <i>engl.</i> )                           |
| G418           | Geneticin   |
| Ga             | Gallium   |
| GDP            | Guanosindiphosphat  |
| GEP-NET        | gastroenteropankreatische neuroendokrine Tumore                             |
| GPCR           | G protein-coupled receptor ( <i>engl.</i> ), G-Protein-gekoppelter Rezeptor |
| G-Protein      | Guanin-Nukleotid-bindendes Protein  |
| GRKs           | G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase   |
| GTP            | Guanosintriphosphat   |
| HA             | Hämagglutinin   |
| HEK-293-Zellen | humane embryonale Nieren-Zellen   |
| HER2           | Human epidermal growth factor receptor 2 ( <i>engl.</i> )                   |
| HIF-1 $\alpha$ | Hypoxie-induzierter-Faktor 1 $\alpha$                                       |
| HIV, HI-Virus  | Human Immunodeficiency Virus ( <i>engl.</i> ), humaner Immundefizienz-Virus |
| HPF            | High Power Field ( <i>engl.</i> ), Gesichtsfeld bei 40x Vergrößerung        |

|                          |  |
|--------------------------|--|
| HRP                      | horseradish peroxidase ( <i>engl.</i> ), Meerrettich-Peroxidase  |
| I                        | Iod  |
| IC <sub>50</sub>         | Inhibitorische Konzentration 50%   |
| IFN- $\gamma$            | Interferon- $\gamma$   |
| IRS                      | Immunreaktivitäts-Score  |
| I-TAC                    | Interferon-inducible T-cell Chemoattractant ( <i>engl.</i> ), Interferon induziertes T-Zell Chemoattraktant                          |
| JAK/STAT                 | Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription ( <i>engl.</i> )   |
| k.A.                     | keine Angabe   |
| kDa                      | Kilodalton   |
| K <sub>i</sub>           | Bindungskonstante  |
| Lambda-PP, $\lambda$ -PP | Lambda-Protein-Phosphatase   |
| LCNEC                    | Large-cell neuroendocrine carcinoma ( <i>engl.</i> ), Großzelliges neuroendokrines Karzinom  |
| LESTR                    | leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor ( <i>engl.</i> ), Leukozyten abgeleiteter sieben-transmembran-Domänen-Rezeptor |
| mRNA                     | messenger-Ribonukleinsäure/ Boten-Ribonukleinsäure   |
| MRT                      | Magnetresonanztomografie   |
| NEN                      | Neuroendokrine Neoplasie   |
| NET                      | Neuroendokriner Tumor  |
| NGS                      | Normales Ziegen-Serum  |
| NSCLC                    | non small cell lung cancer ( <i>engl.</i> ), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom   |
| N-Terminus               | Amino-Terminus   |
| p                        | Irrtumswahrscheinlichkeit  |
| PAGE                     | Polyacrylamid-Gelelektrophorese  |
| PBS                      | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung   |
| PCR                      | polymerase chain reaction ( <i>engl.</i> ), Polymerase-Kettenreaktion  |
| PET-CT                   | Positronen-Emissions-Tomographie-Computertomographie   |
| PRRT                     | Peptide receptor radionuclide therapy ( <i>engl.</i> ), Radioligandentherapie  |
| PVDF                     | Polyvinylidenfluorid   |
| qPCR                     | quantitative PCR   |
| qRT-PCR                  | quantitative reverse-Transkriptase PCR   |
| r                        | Spearman-Rangkorrelationskoeffizient   |
| RNA                      | Ribonukleinsäure   |
| rpm                      | rounds per minute ( <i>engl.</i> ), Umdrehungen pro Minute   |
| RSA                      | Rinderserumalbumin   |
| RT                       | Raumtemperatur   |
| SCLC                     | small cell lung cancer ( <i>engl.</i> ), kleinzelliges Bronchialkarzinom   |
| SDF-1                    | stromal cell derived factor-1, CXCL12 <i>syn.</i>  |
| SDS                      | Natriumdodecylsulfat   |
| SPECT                    | single photon emission computed tomography ( <i>engl.</i> ), Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie                             |
| Tab.                     | Tabelle  |
| TBS-T                    | Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20  |
| TC                       | typisches Karzinoid  |
| TEMED                    | Tetramethylethylendiamin   |

|               |  |
|---------------|--|
| TfR           | Transferin-Rezeptor  |
| TNF- $\alpha$ | Tumornekrosefaktor- $\alpha$   |
| TNM           | Klassifikationssystem: T=Tumor, N=Nodes (Lymphknoten),<br>M=Metas-tase |
| UMB-2         | monoklonaler Antikörper gegen den CXCR4                                |
| WGA           | Weizenkeimagglutinin   |

## Buchstabencodes für Aminosäuren

| Aminosäure            | Abkürzung | Code |
|-----------------------|-----------|------|
| Alanin                | Ala       | A    |
| Arginin               | Arg       | R    |
| Asparagin             | Asn       | N    |
| Asparaginsäure        | Asp       | D    |
| Cystein               | Cys       | C    |
| Glutamin              | Gln       | Q    |
| Glutaminsäure         | Glu       | E    |
| Glycin                | Gly       | G    |
| Histidin              | His       | H    |
| Isoleucin             | Ile       | I    |
| Leucin                | Leu       | L    |
| Lysin                 | Lys       | K    |
| Methionin             | Met       | M    |
| Phenylalanin          | Phe       | F    |
| Prolin                | Pro       | P    |
| Serin                 | Ser       | S    |
| Threonin              | Thr       | T    |
| Tryptophan            | Trp       | W    |
| Tyrosin               | Tyr       | Y    |
| Valin                 | Val       | V    |
| L-3-(2-Naphtyl)Alanin | Nal       |      |

## Literaturverzeichnis

- Aghanejad A, Jalilian AR, Fazaeli Y, Alirezapoor B, Pouladi M, Beiki D, Maus S, Khalaj A. 2014. Synthesis and Evaluation of [(67)Ga]-AMD3100: A Novel Imaging Agent for Targeting the Chemokine Receptor CXCR4. *Sci Pharm*, 82 (1):29-42.
- Al Zobair AA, Al Obeidy BF, Yang L, Yang C, Hui Y, Yu H, Zheng F, Yang G, Xie C, Zhou F, Zhou Y. 2013. Concomitant overexpression of EGFR and CXCR4 is associated with worse prognosis in a new molecular subtype of non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*, 29 (4):1524-1532.
- Ali S, Lazennec G. 2007. Chemokines: novel targets for breast cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, 26 (3-4):401-420.
- Ameri P, Ferone D. 2012. Diffuse endocrine system, neuroendocrine tumors and immunity: what's new? *Neuroendocrinology*, 95 (4):267-276.
- Ayala-Ramirez M, Feng L, Johnson MM, Ejaz S, Habra MA, Rich T, Busaidy N, Cote GJ, Perrier N, Phan A, Patel S, Waguespack S, Jimenez C. 2011. Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab*, 96 (3):717-725.
- Bacon KB, Harrison JK. 2000. Chemokines and their receptors in neurobiology: perspectives in physiology and homeostasis. *J Neuroimmunol*, 104 (1):92-97.
- Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, Arenzana-Seisdedos F, Thelen M, Bachelier F. 2005. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 280 (42):35760-35766.
- Balkwill F. 2004a. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer*, 4 (7):540-550.
- Balkwill F. 2004b. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*, 14 (3):171-179.
- Baumhoer D, Smida J, Zillmer S, Rosemann M, Atkinson MJ, Nelson PJ, Jundt G, von Luetlichau I, Nathrath M. 2012. Strong expression of CXCL12 is associated with a favorable outcome in osteosarcoma. *Mod Pathol*, 25 (4):522-528.
- Beasley MB, Thunnissen FB, Brambilla E, Hasleton P, Steele R, Hammar SP, Colby TV, Sheppard M, Shimosato Y, Koss MN, Falk R, Travis WD. 2000. Pulmonary atypical carcinoid: predictors of survival in 106 cases. *Hum Pathol*, 31 (10):1255-1265.
- Beck-Sickinger AG, Panitz N. 2014. Semi-synthesis of chemokines. *Curr Opin Chem Biol*, 22C:100-107.
- Bellizzi AM. 2013. Assigning site of origin in metastatic neuroendocrine neoplasms: a clinically significant application of diagnostic immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol*, 20 (5):285-314.
- Berghuis D, Schilham MW, Santos SJ, Savola S, Knowles HJ, Dirksen U, Schaefer KL, Vakkila J, Hogendoorn PC, Lankester AC. 2012. The CXCR4-CXCL12 axis in Ewing sarcoma: promotion of tumor growth rather than metastatic disease. *Clin Sarcoma Res*, 2 (1):24.
- Bertout JA, Patel SA, Simon MC. 2008. The impact of O2 availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*, 8 (12):967-975.
- Bodart V, Anastassov V, Darkes MC, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Mosi RM, Neff KS, Nelson KL, Ruzek MC, Patel K, Santucci Z, Scarborough R, Wong RS, Bridger GJ, Macfarland RT, Fricker SP. 2009. Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4. *Biochem Pharmacol*, 78 (8):993-1000.
- Bruhl H, Cohen CD, Linder S, Kretzler M, Schlondorff D, Mack M. 2003. Post-translational and cell type-specific regulation of CXCR4 expression by cytokines. *Eur J Immunol*, 33 (11):3028-3037.
- Buckle T, van Berg NS, Kuil J, Bunschoten A, Oldenburg J, Borowsky AD, Wesseling J, Masada R, Oishi S, Fujii N, van Leeuwen FW. 2012. Non-invasive longitudinal imaging of tumor progression using an (111)indium labeled CXCR4 peptide antagonist. *Am J Nucl Med Mol Imaging*, 2 (1):99-109.
- Burger M, Glodek A, Hartmann T, Schmitt-Graff A, Silberstein LE, Fujii N, Kipps TJ, Burger JA. 2003. Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. *Oncogene*, 22 (50):8093-8101.
- Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, Penfold ME, Sunshine MJ, Littman DR, Kuo CJ, Wei K, McMaster BE, Wright K, Howard MC, Schall TJ. 2006. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med*, 203 (9):2201-2213.



- Cabioglu N, Gong Y, Islam R, Broglio KR, Sneige N, Sahin A, Gonzalez-Angulo AM, Morandi P, Bucana C, Hortobagyi GN, Cristofanilli M. 2007. Expression of growth factor and chemokine receptors: new insights in the biology of inflammatory breast cancer. *Ann Oncol*, 18 (6):1021-1029.
- Cardillo G, Sera F, Di Martino M, Graziano P, Giunti R, Carbone L, Facciolo F, Martelli M. 2004. Bronchial carcinoid tumors: nodal status and long-term survival after resection. *Ann Thorac Surg*, 77 (5):1781-1785.
- Cashen AF, Nervi B, DiPersio J. 2007. AMD3100: CXCR4 antagonist and rapid stem cell-mobilizing agent. *Future Oncol*, 3 (1):19-27.
- Chalkia MT, Stefanoyiannis AP, Chatziioannou SN, Round WH, Efstathopoulos EP, Nikiforidis GC. 2014. Patient-specific dosimetry in peptide receptor radionuclide therapy: a clinical review. *Australas Phys Eng Sci Med*.
- Chatterjee S, Behnam Azad B, Nimmagadda S. 2014. The intricate role of CXCR4 in cancer. *Adv Cancer Res*, 124:31-82.
- Chen G, Wang Z, Liu XY, Liu FY. 2011. High-level CXCR4 expression correlates with brain-specific metastasis of non-small cell lung cancer. *World J Surg*, 35 (1):56-61.
- Clevers H. 2011. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat Med*, 17 (3):313-319.
- Cooper WA, Thourani VH, Gal AA, Lee RB, Mansour KA, Miller JI. 2001. The surgical spectrum of pulmonary neuroendocrine neoplasms. *Chest*, 119 (1):14-18.
- Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. 1997. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *EMBO J*, 16 (23):6996-7007.
- D'Alterio C, Barbieri A, Portella L, Palma G, Polimeno M, Riccio A, Ierano C, Franco R, Scognamiglio G, Bryce J, Luciano A, Rea D, Arra C, Scala S. 2012. Inhibition of stromal CXCR4 impairs development of lung metastases. *Cancer Immunol Immunother*, 61 (10):1713-1720.
- D'Alterio C, Avallone A, Tatangelo F, Delrio P, Pecori B, Cella L, Pelella A, D'Armiento FP, Carlomagno C, Bianco F, Silvestro L, Pacelli R, Napolitano M, Iaffaioli RV, Scala S. 2014. A prognostic model comprising pT stage, N status, and the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 powerfully predicts outcome in neoadjuvant resistant rectal cancer patients. *Int J Cancer*, 135 (2):379-390.
- de Cremoux P, Martin EC, Vincent-Salomon A, Dieras V, Barbaroux C, Liva S, Pouillart P, Sastre-Garau X, Magdelenat H. 1999. Quantitative PCR analysis of c-erb B-2 (HER2/neu) gene amplification and comparison with p185(HER2/neu) protein expression in breast cancer drill biopsies. *Int J Cancer*, 83 (2):157-161.
- De Silva RA, Peyre K, Pullambhatla M, Fox JJ, Pomper MG, Nimmagadda S. 2011. Imaging CXCR4 expression in human cancer xenografts: evaluation of monocyclam 64Cu-AMD3465. *J Nucl Med*, 52 (6):986-993.
- Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. 2011. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*, 286 (37):32188-32197.
- Demmer O, Dijkgraaf I, Schottelius M, Wester HJ, Kessler H. 2008. Introduction of functional groups into peptides via N-alkylation. *Org Lett*, 10 (10):2015-2018.
- Demmer O, Dijkgraaf I, Schumacher U, Marinelli L, Cosconati S, Gourni E, Wester HJ, Kessler H. 2011. Design, synthesis, and functionalization of dimeric peptides targeting chemokine receptor CXCR4. *J Med Chem*, 54 (21):7648-7662.
- Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zarate-Blades CR, Doci CL, Amornphimoltham P, Wang Z, Martin D, Leelahavanichkul K, Dorsam RT, Masedunskas A, Weigert R, Molinolo AA, Gutkind JS. 2014. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Galphan/mTORC1 axis. *FASEB J*.
- Diomedes-Camassei F, McDowell HP, De Ioris MA, Uccini S, Altavista P, Raschella G, Vitali R, Mannarino O, De Sio L, Cozzi DA, Donfrancesco A, Inserra A, Callea F, Dominici C. 2008. Clinical significance of CXC chemokine receptor-4 and c-Met in childhood rhabdomyosarcoma. *Clin Cancer Res*, 14 (13):4119-4127.
- Domanska UM, Kruizinga RC, Nagengast WB, Timmer-Bosscha H, Huls G, de Vries EG, Walenkamp AM. 2013. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. *Eur J Cancer*, 49 (1):219-230.

- Du C, Yao Y, Xue W, Zhu WG, Peng Y, Gu J. 2014. The expression of chemokine receptors CXCR3 and CXCR4 in predicting postoperative tumour progression in stages I-II colon cancer: a retrospective study. *BMJ Open*, 4 (8):e005012.
- Faber A, Roderburg C, Wein F, Saffrich R, Seckinger A, Horsch K, Diehlmann A, Wong D, Bridger G, Eckstein V, Ho AD, Wagner W. 2007. The many facets of SDF-1 $\alpha$ , CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *J Biomed Biotechnol*, 2007 (3):26065.
- Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272 (5263):872-877.
- Ferolla P, Daddi N, Urbani M, Semeraro A, Ribacchi R, Giovenali P, Ascani S, De Angelis V, Crino L, Puma F, Daddi G, Regional Multidisciplinary Group for the D, Treatment of Neuroendocrine Tumors CROURCN. 2009. Tumorlets, multicentric carcinoids, lymph-nodal metastases, and long-term behavior in bronchial carcinoids. *J Thorac Oncol*, 4 (3):383-387.
- Fiegl M, Pircher A, Waldthaler C, Gameraith G, Kocher F, Pall G, Nevinny M, Schmid T, Sterlacci W, Jamnig H, Zangerl G, Zabernigg A, Oberaigner W, Hilbe W. 2014. Small steps of improvement in small-cell lung cancer (SCLC) within two decades: a comprehensive analysis of 484 patients. *Lung Cancer*, 84 (2):168-174.
- Filosso PL, Rena O, Donati G, Casadio C, Ruffini E, Papalia E, Oliaro A, Maggi G. 2002. Bronchial carcinoid tumors: surgical management and long-term outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 123 (2):303-309.
- Fink G, Krelbaum T, Yellin A, Bendayan D, Saute M, Glazer M, Kramer MR. 2001. Pulmonary carcinoid: presentation, diagnosis, and outcome in 142 cases in Israel and review of 640 cases from the literature. *Chest*, 119 (6):1647-1651.
- Fischer T, Nagel F, Jacobs S, Stumm R, Schulz S. 2008. Reassessment of CXCR4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS One*, 3 (12):e4069.
- Fox M, Van Berkel V, Bousamra M, 2nd, Sloan S, Martin RC, 2nd. 2013. Surgical management of pulmonary carcinoid tumors: sublobar resection versus lobectomy. *Am J Surg*, 205 (2):200-208.
- Friedberg JW, Fisher RI. 2008. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 22 (5):941-952, ix.
- Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS. 2010. CXCR4 and cancer. *Pathol Int*, 60 (7):497-505.
- Galsky MD, Vogelzang NJ, Conkling P, Raddad E, Polzer J, Roberson S, Stille JR, Saleh M, Thornton D. 2014. A phase I trial of LY2510924, a CXCR4 peptide antagonist, in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 20 (13):3581-3588.
- Gangadhar T, Nandi S, Salgia R. 2010. The role of chemokine receptor CXCR4 in lung cancer. *Cancer Biol Ther*, 9 (6):409-416.
- Gao Y, Li C, Nie M, Lu Y, Lin S, Yuan P, Sun X. 2014. CXCR4 as a novel predictive biomarker for metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Tumour Biol*, 35 (5):4171-4175.
- Gebauer F, Tachezy M, Effenberger K, von Loga K, Zander H, Marx A, Kaifi JT, Sauter G, Izbicki JR, Bockhorn M. 2011. Prognostic impact of CXCR4 and CXCR7 expression in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 104 (2):140-145.
- George GP, Stevens E, Aberg O, Nguyen QD, Pisaneschi F, Spivey AC, Aboagye EO. 2014. Preclinical evaluation of a CXCR4-specific (68)Ga-labelled TN14003 derivative for cancer PET imaging. *Bioorg Med Chem*, 22 (2):796-803.
- Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, Koenen TB, Krajnc-Franken MA, Gossen JA. 2008. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis*, 46 (5):235-245.
- Ghanem I, Riveiro ME, Paradis V, Faivre S, de Parga PM, Raymond E. 2014. Insights on the CXCL12-CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma carcinogenesis. *Am J Transl Res*, 6 (4):340-352.
- Gourni E, Demmer O, Schottelius M, D'Alessandria C, Schulz S, Dijkgraaf I, Schumacher U, Schwaiger M, Kessler H, Wester HJ. 2011. PET of CXCR4 expression by a (68)Ga-labeled highly specific targeted contrast agent. *J Nucl Med*, 52 (11):1803-1810.
- Gozansky EK, Louis JM, Caffrey M, Clore GM. 2005. Mapping the binding of the N-terminal extracellular tail of the CXCR4 receptor to stromal cell-derived factor-1 $\alpha$ . *J Mol Biol*, 345 (4):651-658.
- Guan G, Zhang Y, Lu Y, Liu L, Shi D, Wen Y, Yang L, Ma Q, Liu T, Zhu X, Qiu X, Zhou Y. 2015. The HIF-1 $\alpha$ /CXCR4 pathway supports hypoxia-induced metastasis of human osteosarcoma cells. *Cancer Lett*, 357 (1):254-264.

- Gudmundsson KS, Sebahar PR, Richardson LD, Miller JF, Turner EM, Catalano JG, Spaltenstein A, Lawrence W, Thomson M, Jenkinson S. 2009. Amine substituted N-(1H-benzimidazol-2-ylmethyl)-5,6,7,8-tetrahydro-8-quinolinamines as CXCR4 antagonists with potent activity against HIV-1. *Bioorg Med Chem Lett*, 19 (17):5048-5052.
- Guo M, Cai C, Zhao G, Qiu X, Zhao H, Ma Q, Tian L, Li X, Hu Y, Liao B, Ma B, Fan Q. 2014. Hypoxia promotes migration and induces CXCR4 expression via HIF-1 $\alpha$  activation in human osteosarcoma. *PLoS One*, 9 (3):e90518.
- Gustafsson BI, Kidd M, Chan A, Malfertheiner MV, Modlin IM. 2008. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer*, 113 (1):5-21.
- Guyon A. 2014. CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. *Front Cell Neurosci*, 8:65.
- Hao M, Zheng J, Hou K, Wang J, Chen X, Lu X, Bo J, Xu C, Shen K, Wang J. 2012. Role of chemokine receptor CXCR7 in bladder cancer progression. *Biochem Pharmacol*, 84 (2):204-214.
- Hartmann TN, Burger M, Burger JA. 2004. The role of adhesion molecules and chemokine receptor CXCR4 (CD184) in small cell lung cancer. *J Biol Regul Homeost Agents*, 18 (2):126-130.
- Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, Fujii N, Burger M. 2005. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling co-operate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells. *Oncogene*, 24 (27):4462-4471.
- Hassan MM, Phan A, Li D, Dagohoy CG, Leary C, Yao JC. 2008. Risk factors associated with neuroendocrine tumors: A U.S.-based case-control study. *Int J Cancer*, 123 (4):867-873.
- Hattermann K, Holzenburg E, Hans F, Lucius R, Held-Feindt J, Mentlein R. 2014. Effects of the chemokine CXCL12 and combined internalization of its receptors CXCR4 and CXCR7 in human MCF-7 breast cancer cells. *Cell Tissue Res*, 357 (1):253-266.
- Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, Mentlein R. 2010. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer Res*, 70 (8):3299-3308.
- He H, Wang C, Shen Z, Fang Y, Wang X, Chen W, Liu F, Qin X, Sun Y. 2013. Upregulated expression of C-X-C chemokine receptor 4 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. *PLoS One*, 8 (8):e71864.
- Heigener DF, Diemel KD, Reck M, Gatzemeier U. 2008. Diagnostics and staging procedures in non-small cell lung cancer - is less more? *Clin Respir J*, 2 (2):67-73.
- Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Vee R, Bremmes RM, Baron AE, Zeng C, Franklin WA. 2003. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*, 21 (20):3798-3807.
- Horsch D, Sayeg Y, Bonnet R, Kaemmerer D, Presselt N, Baum RP. 2012. [Expert dialogue: neuroendocrine tumours of the lungs and gastroenteropancreatic system]. *Pneumologie*, 66 (1):44-48.
- Huang Y, Zhang J, Cui ZM, Zhao J, Zheng Y. 2013. Expression of the CXCL12/CXCR4 and CXCL16/CXCR6 axes in cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Chin J Cancer*, 32 (5):289-296.
- Hummel S, Van Aken H, Zarbock A. 2014. Inhibitors of CXC chemokine receptor type 4: putative therapeutic approaches in inflammatory diseases. *Curr Opin Hematol*, 21 (1):29-36.
- Hurowitz EH, Melnyk JM, Chen YJ, Kouros-Mehr H, Simon MI, Shizuya H. 2000. Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  subunit genes. *DNA Res*, 7 (2):111-120.
- Iglesias M, Belda J, Baldo X, Gimferrer JM, Catalan M, Rubio M, Serra M. 2004. [Bronchial carcinoid tumor: a retrospective analysis of 62 surgically treated cases]. *Arch Bronconeumol*, 40 (5):218-221.
- Ilhan A, Nabokikh A, Maj M, Vidakovic M, Nielsen JH, Prikoszovich T, Niederle B, Base W, Luger A, Wagner L. 2009. CXCL12/SDF-1 over-expression in human insulinomas and its biological relevance. *Mol Cell Endocrinol*, 298 (1-2):1-10.
- Imai H, Sunaga N, Shimizu Y, Kakegawa S, Shimizu K, Sano T, Ishizuka T, Oyama T, Saito R, Minna JD, Mori M. 2010. Clinicopathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 23 (1):153-164.
- Inokuchi E, Oishi S, Kubo T, Ohno H, Shimura K, Matsuoka M, Fujii N. 2011. Potent CXCR4 antagonists containing amidine type Peptide bond isosteres. *ACS Med Chem Lett*, 2 (6):477-480.
- Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AK. 2015. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp Mol Pathol*.

- Izumi D, Ishimoto T, Yoshida N, Nakamura K, Kosumi K, Tokunaga R, Sugihara H, Sawayama H, Karashima R, Imamura Y, Ida S, Hiyoshi Y, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Watanabe M, Baba H. 2014. A clinicopathological analysis of primary mucosal malignant melanoma. *Surg Today*.
- Jacobson O, Weiss ID, Szajek L, Farber JM, Kiesewetter DO. 2009. <sup>64</sup>Cu-AMD3100--a novel imaging agent for targeting chemokine receptor CXCR4. *Bioorg Med Chem*, 17 (4):1486-1493.
- Jain S, Xu R, Prieto VG, Lee P. 2010. Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol*, 3 (4):416-428.
- Jin F, Brockmeier U, Otterbach F, Metzen E. 2012. New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res*, 10 (8):1021-1031.
- Kaemmerer D, Specht E, Sanger J, Wirtz RM, Sayeg M, Schulz S, Lupp A. 2015. Somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms: new diagnostic, prognostic, and therapeutic markers. *J Clin Endocrinol Metab*, 100 (3):831-840.
- Kaemmerer D, Reimann C, Specht E, Wirtz RM, Sayeg M, Baum RP, Schulz S, Lupp A. 2014. Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Oncotarget*.
- Kalemkerian GP, Akerley W, Bogner P, Borghaei H, Chow LQ, Downey RJ, Gandhi L, Ganti AK, Govindan R, Greco JC, Hayman J, Heist RS, Horn L, Jahan T, Koczywas M, Loo BW, Jr., Merritt RE, Moran CA, Niell HB, O'Malley J, Patel JD, Ready N, Rudin CM, Williams CC, Jr., Gregory K, Hughes M, National Comprehensive Cancer N. 2013. Small cell lung cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, 11 (1):78-98.
- Kazarian M, Laird-Offringa IA. 2011. Small-cell lung cancer-associated autoantibodies: potential applications to cancer diagnosis, early detection, and therapy. *Mol Cancer*, 10:33.
- Kim JM, Lee YH, Ku CR, Lee EJ. 2011. The cyclic pentapeptide d-Arg3FC131, a CXCR4 antagonist, induces apoptosis of somatotrope tumor and inhibits tumor growth in nude mice. *Endocrinology*, 152 (2):536-544.
- Kim SW, Kim HY, Song IC, Jin SA, Lee HJ, Yun HJ, Kim S, Jo DY. 2008. Cytoplasmic trapping of CXCR4 in hepatocellular carcinoma cell lines. *Cancer Res Treat*, 40 (2):53-61.
- Klein KR, Karpnich NO, Espenschied ST, Willcockson HH, Dunworth WP, Hoopes SL, Kushner EJ, Bautch VL, Caron KM. 2014. Decoy receptor CXCR7 modulates adrenomedullin-mediated cardiac and lymphatic vascular development. *Dev Cell*, 30 (5):528-540.
- Kobayashi K, Oishi S, Hayashi R, Tomita K, Kubo T, Tanahara N, Ohno H, Yoshikawa Y, Furuya T, Hoshino M, Fujii N. 2012. Structure-activity relationship study of a CXC chemokine receptor type 4 antagonist, FC131, using a series of alkene dipeptide isosteres. *J Med Chem*, 55 (6):2746-2757.
- Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, Hirose M, Maeda Y, Takahashi H, Terashima Y, Matsushima K, Shimada I. 2009. Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 284 (50):35240-35250.
- Kommoss S, Schmidt D, Kommoss F, Hedderich J, Harter P, Pfisterer J, du Bois A. 2009. Histological grading in a large series of advanced stage ovarian carcinomas by three widely used grading systems: consistent lack of prognostic significance. A translational research subprotocol of a prospective randomized phase III study (AGO-OVAR 3 protocol). *Virchows Arch*, 454 (3):249-256.
- Konoplev S, Jorgensen JL, Thomas DA, Lin E, Burger J, Kantarjian HM, Andreeff M, Medeiros LJ, Konopleva M. 2011. Phosphorylated CXCR4 is associated with poor survival in adults with B-acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 117 (20):4689-4695.
- Konoplev S, Lin P, Yin CC, Lin E, Nogueras Gonzalez GM, Kantarjian HM, Andreeff M, Medeiros LJ, Konopleva M. 2013. CXC chemokine receptor 4 expression, CXC chemokine receptor 4 activation, and wild-type nucleophosmin are independently associated with unfavorable prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 13 (6):686-692.
- Koshiba T, Hosotani R, Miyamoto Y, Ida J, Tsuji S, Nakajima S, Kawaguchi M, Kobayashi H, Doi R, Hori T, Fujii N, Imamura M. 2000. Expression of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 ligand receptor system in pancreatic cancer: a possible role for tumor progression. *Clin Cancer Res*, 6 (9):3530-3535.
- Kwong J, Kulbe H, Wong D, Chakravarty P, Balkwill F. 2009. An antagonist of the chemokine receptor CXCR4 induces mitotic catastrophe in ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 8 (7):1893-1905.

- Lagerstrom MC, Schioth HB. 2008. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 7 (4):339-357.
- Lawrence B, Gustafsson BI, Chan A, Svejda B, Kidd M, Modlin IM. 2011. The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 40 (1):1-18, vii.
- Lesniak WG, Sikorska E, Shallal H, Behnam Azad B, Lisok A, Pullambhatla M, Pomper MG, Nimmagadda S. 2015. Structural Characterization and in Vivo Evaluation of beta-Hairpin Peptidomimetics as Specific CXCR4 Imaging Agents. *Mol Pharm*.
- Levoye A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. 2009. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood*, 113 (24):6085-6093.
- Li Y, Shen Y, Miao Y, Luan Y, Sun B, Qiu X. 2014. Co-expression of uPAR and CXCR4 promotes tumor growth and metastasis in small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 7 (7):3771-3780.
- Lieberman J, Sartelet H, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, Vassal G, Joseph JM, Gross N. 2012. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS One*, 7 (8):e43665.
- Liu WS, Zhao LJ, Wang S, Gong LL, Liu ZY, Yuan ZY, Wang P. 2014. Benefits of postoperative radiotherapy in multimodality treatment of resected small-cell lung cancer with lymph node metastasis. *Eur J Surg Oncol*, 40 (9):1156-1162.
- Loetscher M, Geiser T, O'Reilly T, Zwahlen R, Baggiolini M, Moser B. 1994. Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, 269 (1):232-237.
- Lu Z, Qi L, Bo XJ, Liu GD, Wang JM, Li G. 2013. Expression of CD26 and CXCR4 in prostate carcinoma and its relationship with clinical parameters. *J Res Med Sci*, 18 (8):647-652.
- Luchtenborg M, Riaz SP, Lim E, Page R, Baldwin DR, Jakobsen E, Vedsted P, Lind M, Peake MD, Mellemgaard A, Spicer J, Lang-Lazdunski L, Moller H. 2014. Survival of patients with small cell lung cancer undergoing lung resection in England, 1998-2009. *Thorax*, 69 (3):269-273.
- Luckraz H, Amer K, Thomas L, Gibbs A, Butchart EG. 2006. Long-term outcome of bronchoscopically resected endobronchial typical carcinoid tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 132 (1):113-115.
- Luker KE, Gupta M, Luker GD. 2009. Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation. *FASEB J*, 23 (3):823-834.
- Luker KE, Lewin SA, Mihalko LA, Schmidt BT, Winkler JS, Coggins NL, Thomas DG, Luker GD. 2012. Scavenging of CXCL12 by CXCR7 promotes tumor growth and metastasis of CXCR4-positive breast cancer cells. *Oncogene*, 31 (45):4750-4758.
- Lv S, Yang Y, Kwon S, Han M, Zhao F, Kang H, Dai C, Wang R. 2014. The association of CXCR4 expression with prognosis and clinicopathological indicators in colorectal carcinoma patients: a meta-analysis. *Histopathology*, 64 (5):701-712.
- Ma M, Wang M, Xu Y, Hu K, Liu H, Li L, Zhong W, Zhang L, Zhao J, Wang H. 2014. [First-line chemotherapy and its survival analysis of 394 patients with extensive-stage small cell lung cancer in a single institute]. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*, 17 (1):8-14.
- Madrid-Carbajal C, Garcia-Clemente M, Pando-Sandoval A, Cubillas Martin H, Gonzalez-Budino T, Casan-Clara P. 2013. [Bronchial carcinoid tumor: study of 60 patients]. *Med Clin (Barc)*, 141 (2):73-76.
- Mahaseth H, Kaufman J. 2012. Optimizing stem cell collection through CXCR4 antagonists. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4:611-619.
- Marchese A. 2014. Endocytic trafficking of chemokine receptors. *Curr Opin Cell Biol*, 27:72-77.
- Marunaka Y, Niisato N, Miyazaki H. 2005. New concept of spare receptors and effectors. *J Membr Biol*, 203 (1):31-39.
- Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, Kleer CG, Essner JJ, Nasevicius A, Luker GD, Howard MC, Schall TJ. 2007. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (40):15735-15740.
- Milligan G. 2013. The prevalence, maintenance, and relevance of G protein-coupled receptor oligomerization. *Mol Pharmacol*, 84 (1):158-169.
- Miyoshi K, Kohashi K, Fushimi F, Yamamoto H, Kishimoto J, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. 2014. Close correlation between CXCR4 and VEGF expression and frequent CXCR7 expression in rhabdomyosarcoma. *Hum Pathol*, 45 (9):1900-1909.
- Mizukami T, Kamachi H, Mitsunashi T, Tsuruga Y, Hatanaka Y, Kamiyama T, Matsuno Y, Taketomi A. 2014. Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in pancreatic adenocarcinoma patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. *BMC Cancer*, 14:687.

- Modlin IM, Moss SF, Chung DC, Jensen RT, Snyderwine E. 2008. Priorities for improving the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *J Natl Cancer Inst*, 100 (18):1282-1289.
- Mortensen J, Gutte H. 2014. SPECT/CT and pulmonary embolism. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 41 Suppl 1:S81-90.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25 (2):75-84.
- Mosi RM, Anastassova V, Cox J, Darkes MC, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, Nelson KL, Patel K, Santucci Z, Wong RS, Skerlj RT, Bridger GJ, Huskens D, Schols D, Fricker SP. 2012. The molecular pharmacology of AMD11070: an orally bioavailable CXCR4 HIV entry inhibitor. *Biochem Pharmacol*, 83 (4):472-479.
- Mueller W, Schutz D, Nagel F, Schulz S, Stumm R. 2013. Hierarchical organization of multi-site phosphorylation at the CXCR4 C terminus. *PLoS One*, 8 (5):e64975.
- Munoz-Guerra MF, Fernandez-Contreras ME, Moreno AL, Martin ID, Herraez B, Gamallo C. 2009. Polymorphisms in the hypoxia inducible factor 1-alpha and the impact on the prognosis of early stages of oral cancer. *Ann Surg Oncol*, 16 (8):2351-2358.
- Naalsund A, Rostad H, Strom EH, Lund MB, Strand TE. 2011. Carcinoid lung tumors--incidence, treatment and outcomes: a population-based study. *Eur J Cardiothorac Surg*, 39 (4):565-569.
- Nagasawa T. 2014. CXC chemokine ligand 12 (CXCL12) and its receptor CXCR4. *J Mol Med (Berl)*, 92 (5):433-439.
- Nakamura T, Furunaka H, Miyata T, Tokunaga F, Muta T, Iwanaga S, Niwa M, Takao T, Shimonishi Y. 1988. Tachyplesin, a class of antimicrobial peptide from the hemocytes of the horseshoe crab (*Tachypleus tridentatus*). Isolation and chemical structure. *J Biol Chem*, 263 (32):16709-16713.
- Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, Rot A, Thelen M. 2010. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 5 (2):e9175.
- Nikkhoo B, Jalili A, Fakhari S, Sheikhesmaili F, Fathi F, Rooshani D, Hoseinpour Feizi MA, Nikzaban M. 2014. Nuclear pattern of CXCR4 expression is associated with a better overall survival in patients with gastric cancer. *J Oncol*, 2014:808012.
- Nimmagadda S, Pullambhatla M, Pomper MG. 2009. Immunoimaging of CXCR4 expression in brain tumor xenografts using SPECT/CT. *J Nucl Med*, 50 (7):1124-1130.
- Oda Y, Tateishi N, Matono H, Matsuura S, Yamamoto H, Tamiya S, Yokoyama R, Matsuda S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. 2009. Chemokine receptor CXCR4 expression is correlated with VEGF expression and poor survival in soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer*, 124 (8):1852-1859.
- Oishi S, Fujii N. 2012. Peptide and peptidomimetic ligands for CXC chemokine receptor 4 (CXCR4). *Org Biomol Chem*, 10 (30):5720-5731.
- Oka Y, Saraiva LR, Kwan YY, Korsching SI. 2009. The fifth class of Galpha proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106 (5):1484-1489.
- Okoye CC, Jablons DM, Jahan TM, Kukreja J, Cardozo S, Yom SS. 2014. Divergent management strategies for typical versus atypical carcinoid tumors of the thoracic cavity. *Am J Clin Oncol*, 37 (4):350-355.
- Okudela K, Woo T, Mitsui H, Tajiri M, Masuda M, Ohashi K. 2012. Expression of the potential cancer stem cell markers, CD133, CD44, ALDH1, and beta-catenin, in primary lung adenocarcinoma--their prognostic significance. *Pathol Int*, 62 (12):792-801.
- Otani Y, Kijima T, Kohno S, Oishi S, Minami T, Nagatomo I, Takahashi R, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Fujii N, Kumanogoh A. 2012. Suppression of metastases of small cell lung cancer cells in mice by a peptidic CXCR4 inhibitor TF14016. *FEBS Lett*, 586 (20):3639-3644.
- Otsuka S, Klimowicz AC, Kopciuk K, Petrillo SK, Konno M, Hao D, Muzik H, Stolte E, Boland W, Morris D, Magliocco AM, Bebb DG. 2011. CXCR4 overexpression is associated with poor outcome in females diagnosed with stage IV non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6 (7):1169-1178.
- Otte M, Kliever A, Schutz D, Reimann C, Schulz S, Stumm R. 2014. CXCL14 is no direct modulator of CXCR4. *FEBS Lett*, 588 (24):4769-4775.
- Pedrosa JA, Koch MO, Kaimakiotis HZ, Monn MF, Masterson TA, Rice KR, Cary KC, Foster RS, Bihle R, Cheng L. 2015. Three-tiered nodal classification system for bladder cancer: a new proposal. *Future Oncol*, 11 (3):399-408.

- Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J. 2005. Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens: a major pitfall in the management of lung cancer patients. *Am J Surg Pathol*, 29 (2):179-187.
- Pfeiffer M, Hartmann TN, Leick M, Catusse J, Schmitt-Graeff A, Burger M. 2009. Alternative implication of CXCR4 in JAK2/STAT3 activation in small cell lung cancer. *Br J Cancer*, 100 (12):1949-1956.
- Pils D, Pinter A, Reibenwein J, Alfanz A, Horak P, Schmid BC, Hefler L, Horvat R, Reinthaller A, Zeillinger R, Krainer M. 2007. In ovarian cancer the prognostic influence of HER2/neu is not dependent on the CXCR4/SDF-1 signalling pathway. *Br J Cancer*, 96 (3):485-491.
- Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, Park K, de Marinis F, Eberhardt WE, Paz-Ares L, Storkel S, Schumacher KM, von Heydebreck A, Celik I, O'Byrne KJ. 2012. EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *Lancet Oncol*, 13 (1):33-42.
- Popple A, Durrant LG, Spendlove I, Rolland P, Scott IV, Deen S, Ramage JM. 2012. The chemokine, CXCL12, is an independent predictor of poor survival in ovarian cancer. *Br J Cancer*, 106 (7):1306-1313.
- Proudfoot AE, Power CA, Schwarz MK. 2010. Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert Opin Investig Drugs*, 19 (3):345-355.
- Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, Gerard C, Lefkowitz RJ. 2010. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107 (2):628-632.
- Ramahi E, Choi J, Fuller CD, Eng TY. 2013. Merkel cell carcinoma. *Am J Clin Oncol*, 36 (3):299-309.
- Remmele W, Stegner HE. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8 (3):138-140.
- Retz MM, Sidhu SS, Blaveri E, Kerr SC, Dolganov GM, Lehmann J, Carroll P, Simko J, Waldman FM, Basbaum C. 2005. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *Int J Cancer*, 114 (2):182-189.
- Rollins BJ. 1997. Chemokines. *Blood*, 90 (3):909-928.
- Rosenkilde MM, Gerlach LO, Hatse S, Skerlj RT, Schols D, Bridger GJ, Schwartz TW. 2007. Molecular mechanism of action of monocyclam versus bicyclam non-peptide antagonists in the CXCR4 chemokine receptor. *J Biol Chem*, 282 (37):27354-27365.
- Sanchez-Fernandez G, Cabezudo S, Garcia-Hoz C, Beninca C, Aragay AM, Mayor F, Jr., Ribas C. 2014. Galphaq signalling: the new and the old. *Cell Signal*, 26 (5):833-848.
- Sawada S, Komori E, Yamashita M, Nakata M, Nishimura R, Teramoto N, Segawa Y, Shinkai T. 2007. Comparison in prognosis after VATS lobectomy and open lobectomy for stage I lung cancer: retrospective analysis focused on a histological subgroup. *Surg Endosc*, 21 (9):1607-1611.
- Sayeg Y, Sayeg M, Baum RP, Kulkarni HR, Presselt N, Mader I, Kunze A, Sanger J, Horsch D, Bonnet R. 2014. [Pulmonary neuroendocrine neoplasms]. *Pneumologie*, 68 (7):456-477.
- Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. 2011. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Semin Diagn Pathol*, 28 (2):167-177.
- Schneider M, Huber J, Hadaschik B, Siegers GM, Fiebig HH, Schuler J. 2012. Characterization of colon cancer cells: a functional approach characterizing CD133 as a potential stem cell marker. *BMC Cancer*, 12:96.
- Scholten DJ, Canals M, Maussang D, Roumen L, Smit MJ, Wijnmans M, de Graaf C, Vischer HF, Leurs R. 2012. Pharmacological modulation of chemokine receptor function. *Br J Pharmacol*, 165 (6):1617-1643.
- Schonemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. 2008. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *J Comp Neurol*, 510 (2):207-220.
- Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT. 2002. Non-peptidic chemokine receptors antagonists as emerging anti-HIV agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 17 (2):69-76.
- Sekiya R, Kajiyama H, Sakai K, Umezaki T, Mizuno M, Shibata K, Yamamoto E, Fujiwara S, Nagasaka T, Kikkawa F. 2012. Expression of CXCR4 indicates poor prognosis in patients with clear cell carcinoma of the ovary. *Hum Pathol*, 43 (6):904-910.
- Shin HC, Seo J, Kang BW, Moon JH, Chae YS, Lee SJ, Lee YJ, Han S, Seo SK, Kim JG, Sohn SK, Park TI. 2014. Clinical significance of nuclear factor kappaB and chemokine receptor

- CXCR4 expression in patients with diffuse large B-cell lymphoma who received rituximab-based therapy. *Korean J Intern Med*, 29 (6):785-792.
- Shukla AK, Singh G, Ghosh E. 2014. Emerging structural insights into biased GPCR signaling. *Trends Biochem Sci*, 39 (12):594-602.
- Siddiqui MT. 2010. Pulmonary neuroendocrine neoplasms: a review of clinicopathologic and cytologic features. *Diagn Cytopathol*, 38 (8):607-617.
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. 1991. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252 (5007):802-808.
- Smith EW, Liu Y, Getschman AE, Peterson FC, Ziarek JJ, Li R, Volkman BF, Chen Y. 2014. Structural analysis of a novel small molecule ligand bound to the CXCL12 chemokine. *J Med Chem*, 57 (22):9693-9699.
- Soga J, Yakuwa Y. 1999. Bronchopulmonary carcinoids: An analysis of 1,875 reported cases with special reference to a comparison between typical carcinoids and atypical varieties. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 5 (4):211-219.
- Spano JP, Andre F, Morat L, Sabatier L, Besse B, Combadiere C, Deterre P, Martin A, Azorin J, Valeyre D, Khayat D, Le Chevalier T, Soria JC. 2004. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol*, 15 (4):613-617.
- Specht E, Kaemmerer D, Sanger J, Wirtz RM, Schulz S, Lupp A. 2015. Comparison of IRS, HER2/neu-Score and H-Score for the immunohistochemical evaluation of somatostatin receptors in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. *Histopathology*.
- Sterlacci W, Savic S, Fiegl M, Obermann E, Tzankov A. 2014. Putative stem cell markers in non-small-cell lung cancer: a clinicopathologic characterization. *J Thorac Oncol*, 9 (1):41-49.
- Steuer CE, Behera M, Kim S, Chen Z, Saba NF, Pillai RN, Owonikoko TK, Khuri FR, Ramalingam SS. 2015. Atypical carcinoid tumor of the lung: a surveillance, epidemiology, and end results database analysis. *J Thorac Oncol*, 10 (3):479-485.
- Sturm N, Rossi G, Lantuejoul S, Papotti M, Frachon S, Claraz C, Brichon PY, Brambilla C, Brambilla E. 2002. Expression of thyroid transcription factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferations with special interest in carcinoids. *Hum Pathol*, 33 (2):175-182.
- Su L, Zhang Z, Ji W. 2014. [Up-regulation of the CXCR4 expression by hypoxia in maxillary sinus carcinoma cells IMC3]. *Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi*, 28 (8):548-550.
- Sun Y, Mao X, Fan C, Liu C, Guo A, Guan S, Jin Q, Li B, Yao F, Jin F. 2014. CXCL12-CXCR4 axis promotes the natural selection of breast cancer cell metastasis. *Tumour Biol*, 35 (8):7765-7773.
- Takenaka T, Takenoyama M, Inamasu E, Yoshida T, Toyokawa G, Nosaki K, Hirai F, Yamaguchi M, Shimokawa M, Seto T, Ichinose Y. 2015. Role of surgical resection for patients with limited disease-small cell lung cancer. *Lung Cancer*.
- Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Masuda A, Tamamura H. 2010. Bivalent ligands of CXCR4 with rigid linkers for elucidation of the dimerization state in cells. *J Am Chem Soc*, 132 (45):15899-15901.
- Tanegashima K, Suzuki K, Nakayama Y, Tsuji K, Shigenaga A, Otaka A, Hara T. 2013. CXCL14 is a natural inhibitor of the CXCL12-CXCR4 signaling axis. *FEBS Lett*, 587 (12):1731-1735.
- Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. 1993. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science*, 261 (5121):600-603.
- Teicher BA. 2014. Targets in small cell lung cancer. *Biochem Pharmacol*, 87 (2):211-219.
- Teicher BA, Fricker SP. 2010. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 16 (11):2927-2931.
- Thiele S, Mungalpara J, Steen A, Rosenkilde MM, Vabeno J. 2014. Determination of the binding mode for the cyclopentapeptide CXCR4 antagonist FC131 using a dual approach of ligand modifications and receptor mutagenesis. *Br J Pharmacol*.
- Toyozawa S, Kaminaka C, Furukawa F, Nakamura Y, Matsunaka H, Yamamoto Y. 2012. Chemokine receptor CXCR4 is a novel marker for the progression of cutaneous malignant melanomas. *Acta Histochem Cytochem*, 45 (5):293-299.
- Travis WD. 2010. Advances in neuroendocrine lung tumors. *Ann Oncol*, 21 Suppl 7:vii65-71.
- Travis WD, Rush W, Flieder DB, Falk R, Fleming MV, Gal AA, Koss MN. 1998. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarification of criteria for atypical carcinoid and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol*, 22 (8):934-944.
- Tsuda H, Tani Y, Hasegawa T, Fukutomi T. 2001. Concordance in judgments among c-erbB-2 (HER2/neu) overexpression detected by two immunohistochemical tests and gene



- amplification detected by Southern blot hybridization in breast carcinoma. *Pathol Int*, 51 (1):26-32.
- van de Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, Hillen HF. 2004. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res*, 24 (1):297-301.
- Venkatakrisnan AJ, Flock T, Prado DE, Oates ME, Gough J, Madan Babu M. 2014. Structured and disordered facets of the GPCR fold. *Curr Opin Struct Biol*, 27:129-137.
- Wachtel H, Gupta M, Bartlett EK, Jackson BM, Kelz RR, Karakousis GC, Fraker DL, Roses RE. 2014. Outcomes after resection of leiomyosarcomas of the inferior vena cava: A pooled data analysis of 377 cases. *Surg Oncol*.
- Wald O, Shapira OM, Izhar U. 2013. CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics*, 3 (1):26-33.
- Walentowicz-Sadlecka M, Sadlecki P, Bodnar M, Marszalek A, Walentowicz P, Sokup A, Wilinska-Jankowska A, Grabiec M. 2014. Stromal derived factor-1 (SDF-1) and its receptors CXCR4 and CXCR7 in endometrial cancer patients. *PLoS One*, 9 (1):e84629.
- Wang CI, Lewis RJ. 2013. Emerging opportunities for allosteric modulation of G-protein coupled receptors. *Biochem Pharmacol*, 85 (2):153-162.
- Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, Mehra R, Loberg R, Taichman RS. 2008. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *J Biol Chem*, 283 (7):4283-4294.
- Wang J, Wu N, Zheng Q, Feng Y, Yan S, Lv C, Li S, Wang Y, Yang Y. 2014a. Evaluation of the 7th edition of the TNM classification for lung cancer at a single institution. *J Cancer Res Clin Oncol*, 140 (7):1189-1195.
- Wang JG, Cui L, Jiang T, Li YJ, Wei ZM. 2015. Primary cardiac leiomyosarcoma: An analysis of clinical characteristics and outcome patterns. *Asian Cardiovasc Thorac Ann*.
- Wang L, Wang Z, Liu X, Liu F. 2014b. High-level C-X-C chemokine receptor type 4 expression correlates with brain-specific metastasis following complete resection of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*, 7 (6):1871-1876.
- Wang L, Chen W, Gao L, Yang Q, Liu B, Wu Z, Wang Y, Sun Y. 2012. High expression of CXCR4, CXCR7 and SDF-1 predicts poor survival in renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol*, 10:212.
- Watts AO, van Lipzig MM, Jaeger WC, Seeber RM, van Zwam M, Vinet J, van der Lee MM, Siderius M, Zaman GJ, Boddeke HW, Smit MJ, Pflieger KD, Leurs R, Vischer HF. 2013. Identification and profiling of CXCR3-CXCR4 chemokine receptor heteromer complexes. *Br J Pharmacol*, 168 (7):1662-1674.
- Weiss ID, Jacobson O. 2013. Molecular imaging of chemokine receptor CXCR4. *Theranostics*, 3 (1):76-84.
- Weiss ID, Jacobson O, Kiesewetter DO, Jacobus JP, Szajek LP, Chen X, Farber JM. 2012. Positron emission tomography imaging of tumors expressing the human chemokine receptor CXCR4 in mice with the use of <sup>64</sup>Cu-AMD3100. *Mol Imaging Biol*, 14 (1):106-114.
- Weitzenfeld P, Ben-Baruch A. 2014. The chemokine system, and its CCR5 and CXCR4 receptors, as potential targets for personalized therapy in cancer. *Cancer Lett*, 352 (1):36-53.
- Welte Y, Adjaye J, Lehrach HR, Regenbrecht CR. 2010. Cancer stem cells in solid tumors: elusive or illusive? *Cell Commun Signal*, 8 (1):6.
- Wheat R, Roberts C, Waterboer T, Steele J, Marsden J, Steven NM, Blackburn DJ. 2014. Inflammatory cell distribution in primary merkel cell carcinoma. *Cancers (Basel)*, 6 (2):1047-1064.
- Wong D, Korz W. 2008. Translating an Antagonist of Chemokine Receptor CXCR4: from bench to bedside. *Clin Cancer Res*, 14 (24):7975-7980.
- Wong RS, Bodart V, Metz M, Labrecque J, Bridger G, Fricker SP. 2008. Comparison of the potential multiple binding modes of bicyclam, monocyclam, and noncyclam small-molecule CXC chemokine receptor 4 inhibitors. *Mol Pharmacol*, 74 (6):1485-1495.
- Woodard LE, Nimmagadda S. 2011. CXCR4-based imaging agents. *J Nucl Med*, 52 (11):1665-1669.
- Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, Abagyan R, Brooun A, Wells P, Bi FC, Hamel DJ, Kuhn P, Handel TM, Cherezov V, Stevens RC. 2010. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 330 (6007):1066-1071.
- Xu CZ, Wang PH, Yan XJ, Wang T, Chen D, Zhang ZJ, Shi RJ. 2013a. Expression of CXCR4 is associated with progression and invasion in patients with nasal-surface basal cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 75 (6):332-341.

- Xu L, Li Y, Sun H, Li D, Hou T. 2013b. Structural basis of the interactions between CXCR4 and CXCL12/SDF-1 revealed by theoretical approaches. *Mol Biosyst*, 9 (8):2107-2117.
- Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. 2008. One hundred years after "carcinoid": epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol*, 26 (18):3063-3072.
- Yates TJ, Knapp J, Gosalbez M, Lokeshwar SD, Gomez CS, Benitez A, Ekwenna OO, Young EE, Manoharan M, Lokeshwar VB. 2013. C-X-C chemokine receptor 7: a functionally associated molecular marker for bladder cancer. *Cancer*, 119 (1):61-71.
- Yoshitake N, Fukui H, Yamagishi H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, Ichikawa K, Imura J, Hiraishi H, Fujimori T. 2008. Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 98 (10):1682-1689.
- Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. 2006. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest*, 86 (12):1221-1232.
- Zheng G, Ettinger DS, Maleki Z. 2013. Utility of the quantitative Ki-67 proliferation index and CD56 together in the cytologic diagnosis of small cell lung carcinoma and other lung neuroendocrine tumors. *Acta Cytol*, 57 (3):281-290.
- Zheng S, Shi L, Zhang Y, He T. 2014. Expression of SNCG, MAP2, SDF-1 and CXCR4 in gastric adenocarcinoma and their clinical significance. *Int J Clin Exp Pathol*, 7 (10):6606-6615.
- Zhong C, Wang J, Li B, Xiang H, Ultsch M, Coons M, Wong T, Chiang NY, Clark S, Clark R, Quintana L, Gribling P, Suto E, Barck K, Corpuz R, Yao J, Takkar R, Lee WP, Damico-Beyer LA, Carano RD, Adams C, Kelley RF, Wang W, Ferrara N. 2013. Development and preclinical characterization of a humanized antibody targeting CXCL12. *Clin Cancer Res*, 19 (16):4433-4445.
- Zhu L, Zhao Q, Wu B. 2013. Structure-based studies of chemokine receptors. *Curr Opin Struct Biol*, 23 (4):539-546.
- Zlotnik A, Yoshie O, Nomiya H. 2006. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol*, 7 (12):243.

## Veröffentlichungen und Preise

Hauptteile der vorliegenden Arbeit wurden bei Oncotarget veröffentlicht:

Kaemmerer D\*, Reimann C\*, Specht E, Wirtz RM, Sayeg M, Baum RP, Schulz S and Lupp A. 2014. Differential expression and prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 in bronchopulmonary neuroendocrine neoplasms. Oncotarget. 6(5): 3346-58.

\* Authors contributed equally to this work.

### Weitere Veröffentlichungen:

Otte M, Kliwer A, Schutz D, Reimann C, Schulz S and Stumm R. 2014. CXCL14 is no direct modulator of CXCR4. FEBS letters 588(24): 4769-4775.

11/2012      Jahrestagung der Gesellschaft für innere Medizin Thüringen e.V.  
*Posterpreis:* „The chemokine receptor CXCR4 a potential target in cancer diagnostics and therapy“

10/2013      Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen  
Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie.  
*Posterpreis:* “Over-expression of the chemokine receptor CXCR4 in  
neoplastic tissues: A new target in cancer diagnostics and therapy”

## Lebenslauf

02.10.1980      geboren in Plauen

1987 – 1991      Otto-Grotewohl POS (Grundschule), Plauen

1991 – 1993      17. Schule (Realschule), Plauen

1993 – 1999      Diesterweg-Gymnasium, Plauen, Abitur

2000 - 2006      Friedrich-Schiller-Universität, Jena

Studium der Soziologie, Psychologie und Erziehungswissenschaften

**Abschluss: Magistra Artium**

2007 - 2012      Friedrich-Schiller-Universität, Jena, Studium der Biologie, Diplom

Hauptstudium: Mikrobiologie (HF), medizinische Mikrobiologie (NF),  
Pharmakologie (NF), Grundlagen der Arzneimittelentwicklung (NF)

Thema der Diplomarbeit: Der Chemokinrezeptor CXCR4 und seine Ex-  
pression in normalem und neoplastischem Gewebe

**Abschluss: Diplom-Biologin**

Seit 01/2013      Promotion am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Betreuung von apl. Prof. Dr.  
Amelie Lupp und Prof. Dr. Stefan Schulz

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Stefan Schulz für die Vergabe des Themas und die Möglichkeit an seinem Institut die vorliegende Arbeit anfertigen zu dürfen.

Danken möchte ich auch Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp für die Betreuung meiner Arbeit, ihre Unterstützung während meiner Zeit am Institut und die zahlreiche investierte Zeit, nicht nur für das Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Auch Dr. rer. nat. Falko Nagel gilt mein Dank für seine fachliche Unterstützung, das Korrekturlesen und dafür, dass er stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Frau Heidrun Guder danke ich herzlich für die technische Unterstützung. Weiterhin danke ich Elisa Specht, Daniel Kämmerer, Ralph Wirtz und Manal Sayeg.

Meinem Kollegen Thomas Günther möchte ich für die vielen netten Mittagessen und die gemeinsamen erhellenden Gespräche danken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für die gemeinsame Zeit.

Meiner Tochter Annabelle und meinem Partner Martin möchte ich sehr dafür danken, dass sie mich auch in manchmal schwierigen Zeiten unterstützt, motiviert und ertragen haben.

Mein größter Dank gilt jedoch meinen Eltern Christine und Harry Reimann, die mich immer unterstützt haben, die immer für mich da sind und mir oftmals erfolgreich klar machen konnten, was die eigentlichen Vesten des Lebens sind.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat: Prof. Dr. Amelie Lupp.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen, Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Die gleiche oder in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung habe ich nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, April 2015